

**UNIVERSIDAD DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
Sección de Químicas.



TESIS DOCTORAL

**Contribución al estudio de la farmacología y mecanismo de  
acción hipoglucemiante de la Carbutamida (1-Butil-3-  
Sulfanililurea) mediante marcado con  $^{35}\text{S}$**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**José Ramón Fernández Lizarbe**

Madrid, 2015

**UNIVERSIDAD DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS-SECCION DE QUIMICAS**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5322361399

T1  
5321  
742

**CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA FARMACOLOGIA  
Y MECANISMO DE ACCION HIPOGLUCEMIANTE DE  
LA CARBUTAMIDA (1-BUTIL-3-SULFANILILUREA)  
MEDIANTE MARCADO CON  $^{35}\text{S}$**

por

**JOSE RAMON FERNANDEZ LIZARBE**

621047546  
;3551222

**MEMORIA**

presentada para aspirar al  
**GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS**

**JUNTA DE ENERGIA NUCLEAR**

**MADRID, ABRIL 1971**

## INDI E

Agradecimiento. . . . .	vii
Resumen. . . . .	viii
1. INTRODUCCION . . . . .	1
1.1. LAS SULFONILUREAS HIPOGLUCEMIANTES . . . . .	2
1.2. DATOS FARMACOLOGICOS . . . . .	7
1.2.1. Absorción . . . . .	7
1.2.2. Niveles hemáticos y su relación con la actividad hipoglucémica . . . . .	7
1.2.3. Distribución . . . . .	8
1.2.4. Metabolismo y excreción . . . . .	9
1.3. MECANISMO DE ACCION . . . . .	10
1.3.1. Estimulación de la secreción insulínica	12
1.3.1.1. Cambios morfológicos . . . . .	12
1.3.1.2. Estudios "in vitro" . . . . .	14
1.3.1.3. Estudios "in vivo" . . . . .	21
1.3.2. Influencia de las sulfonilureas hipoglucemiantes a nivel hepático . . . . .	24

1.3.3. Efectos de las sulfonilureas en tejidos periféricos . . . . .	27
1.4. PLAN DE TRABAJO . . . . .	31
2. TECNICAS Y METODOS DE TRABAJO . . . . .	35
2.1. TECNICAS RADIOMETRICAS . . . . .	35
2.1.1. Contaje por centelleo líquido de $^{35}\text{S}$ . .	35
2.1.1.1. Aspectos generales . . . . .	35
2.1.1.2. Determinación de las condiciones óptimas y la eficiencia del conteo . . . . .	38
2.1.2. Medidas de actividad en diferentes materiales . . . . .	44
2.1.2.1. Medidas de actividad en tejidos animales . . . . .	45
2.1.2.2. Medida de actividades en sangre y orina . . . . .	47
2.1.2.3. Utilización de Solueno como agente solubilizante . . . . .	48
2.1.2.4. Corrección de las medidas por autoextinción debida al color de las muestras . . . . .	51

2.1.2.5. Resultados . . . . .	53
2.1.2.6. Medidas en suspensión . . . . .	64
2.2. CONCEPTOS ESTADISTICOS . . . . .	66
2.3. AUTORRADIOGRAFIA . . . . .	71
2.3.1. Autorradiografía de cromatogramas . . .	71
2.3.2. Microautorradiografía histológica . . .	71
2.3.2.1. Preparaciones histológicas . .	73
2.3.2.2. Procedimiento autorradiográfico	79
3. SINTESIS ORGANICA . . . . .	85
3.1. SINTESIS DE SULFANILAMIDA- <sup>35</sup> S. . . . .	85
3.1.1. Preparación de ácido N-acetilsulfanil- lico- <sup>35</sup> S. . . . .	86
3.1.2. Preparación de ácido 4-acetamido- bencenoclorosulfónico- <sup>35</sup> S. . . . .	86
3.1.3. Preparación de N <sup>4</sup> -acetilsulfanilamida- <sup>35</sup> S. . .	87
3.1.4. Preparación de sulfanilamida- <sup>35</sup> S. . . . .	88
3.2. SINTESIS DE 1-BUTIL-3-NITROUREA. . . . .	89

3.3. SINTESIS DE CARBUTAMIDA- <sup>35</sup> S (1-BUTIL-3- -SULFANILILUREA- <sup>35</sup> S) . . . . .	90
3.4. SINTESIS DE N <sup>4</sup> -ACETILCARBUTAMIDA (1-BUTIL- -3-(N <sup>4</sup> -ACETIL-SULFANILIL)UREA). . . . .	90
3.5. IDENTIFICACION Y CONTROL DE PUREZA . . . . .	91
4. EXPERIMENTACION EN ANIMALES. RESULTADOS . . . . .	93
4.1. DISTRIBUCION Y ACUMULACION EN ORGANOS . . . . .	93
4.1.1. Administración de carbutamida- <sup>35</sup> S. Dosis utilizadas . . . . .	94
4.1.2. Correlación de resultados . . . . .	97
4.1.3. Extracción de órganos y preparación y medida de muestras . . . . .	100
4.1.4. Resultados . . . . .	100
4.1.4.1. Dosis no hipoglucémica (Dosis A)	101
4.1.4.2. Dosis hipoglucémica (Dosis B).	103
4.1.5. Niveles hemáticos de actividad. . . . .	105
4.1.6. Discusión de resultados . . . . .	106
4.2. EXCRECION . . . . .	110
4.2.1. Excreción en heces. Resultados . . . . .	111

4.2.2. Excreción en orina. Resultados . . . . .	111
4.2.3. Identificación de metabolitos en orina . .	114
4.2.4. Determinación cuantitativa de metabolitos.	116
4.2.5. Discusión de resultados . . . . .	118
4.3. MECANISMO DE ELIMINACION . . . . .	120
4.3.1. Identificación y determinación de carbu- tamida marcada y posibles metabolitos, en hígado y contenido duodenal . . . . .	123
4.3.2. Microautorradiografía de hígado . . . . .	125
4.3.3. Identificación y determinación de carbutamida marcada y posibles me- tabolitos en sangre . . . . .	126
4.3.4. Microautorradiografía de tejido renal. . .	127
4.3.5. Cálculo de la depuración renal de car- butamida marcada . . . . .	128
4.3.6. Discusión de resultados . . . . .	131
4.4. MECANISMO DE ACCION HIPOGLUCEMIANTE. RESULTADOS .	134
4.4.1. Microautorradiografía de páncreas. . . . .	135

4.4.2. Microautorradiografía de cápsulas	
suprarrenales . . . . .	135
4.4.3. Microautorradiografía de músculo	
cardíaco . . . . .	136
4.4.4. Discusión de resultados . . . . .	137
4.4.4.1. Transporte de glucosa en	
la membrana celular. In-	
fluencia de la insulina. . . . .	139
4.4.4.2. Influencia de la carbutamida	
en la incorporación de la	
glucosa al músculo estriado. . .	145
5. CONCLUSIONES . . . . .	152
6. BIBLIOGRAFIA . . . . .	156
ANEXO I: Abreviaturas y Simbolos . . . . .	171
ANEXO II: Indice de Tablas . . . . .	174
ANEXO III: Indice de figuras . . . . .	176



El presente trabajo ha sido realizado en la Sección de Isótopos, División de Química Nuclear de la Dirección de Química e Isótopos de la Junta de Energía Nuclear.

El autor agradece:

A la Dra. D. Rebollo Garrido (Jefe del Grupo de Radiofármacos) su dirección y ayuda en la realización del trabajo y redacción de la memoria.

Al Profesor Dr. A. Fraile Ovejero, que se digna apadrinar este trabajo, su aportación inestimable en la orientación del mismo, así como por la lectura y comentarios del manuscrito.

A los Dres. F. Casas Medina, I. Esparraguera Martínez, J. Fernández González y J. Villar Palasí, de la Sección de Isótopos, su colaboración en diferentes aspectos del trabajo y asimismo al Dr. M. del Val Cob (Jefe de la Sección de Isótopos), su constante estímulo y las facilidades concedidas en todo momento para su realización.

Al Instituto de Estudios Nucleares por la ayuda económica facilitada y a los Sres. D. R. Fernández Cellini (Director de Química e Isótopos) y D. Felipe de la Cruz Castillo (Jefe de la División de Química Nuclear) por las facilidades recibidas.

Finalmente al Servicio de Biblioteca y Documentación de la Junta de Energía Nuclear y a todo el personal técnico y auxiliar que ha colaborado.

Contribución al estudio de la farmacología y mecanismo de acción hipoglucemiante de la carbutamida (1-butil-3-sulfanililurea), mediante marcado con  $^{35}\text{S}$ .

#### RESUMEN

Se sintetiza carbutamida- $^{35}\text{S}$  (1-butil-3-sulfanililurea - $^{35}\text{S}$ ) y se estudian diferentes aspectos de su farmacología y mecanismo de acción hipoglucemiante en ratas, aplicando técnicas radiométricas y microautorradiográficas. Se describe el metabolismo del fármaco y su cinética de distribución y excreción. Los resultados muestran una carencia de acumulación de carbutamida- $^{35}\text{S}$  a nivel de los islotes de Langerhans; por el contrario, en músculo cardíaco, se observa una localización específica de radiactividad a nivel de la membrana celular. En consecuencia, se interpreta que la acción hipoglucemiante de la carbutamida se debe a un efecto de potenciación de la insulina en la participación de la hormona en el transporte de glucosa en el tejido muscular estriado, más bien que a una estimulación directa de la secreción insulínica sobre las células beta pancreáticas. Esta potenciación posiblemente se ejerce mediante disociación de los complejos insulina-proteína presentes en la circulación periférica.

Study of the pharmacology and mechanism of hypoglycaemic action of carbutamide (1-butyl-3-sulfanilylurea), by labeling with  $^{35}\text{S}$ .

#### SUMMARY

Carbutamide- $^{35}\text{S}$  (1-butyl-3-sulfanilylurea- $^{35}\text{S}$ ) has been synthesized and several aspects of its pharmacology and mechanism of hypoglycaemic action in rats are studied by applying radiometric and microautoradiographic techniques. The metabolism and kinetics of distribution and excretion of the drug is described. The results show a lack of accumulation of labeled carbutamide in the pancreatic islets. On the contrary, a specific fixation of radioactivity is found at the cellular membrane level in striated muscle. These results suggest that potentiation of insulin action on the striated muscle sugar transport system, rather than stimulation of insulin release by beta cells, must be the major effect of carbutamide therapy, which explains its hypoglycaemic response. This potentiation of insulin may be exerted by means of an increase in the dissociation of the inactive insulin-protein complex circulating in peripheral blood.

## 1. INTRODUCCION.

## 1. INTRODUCCION.

Los estudios del metabolismo y farmacodinamia de diversos compuestos con acción terapéutica, se vienen realizando en los últimos años con la ayuda de compuestos marcados con diferentes radioisótopos (1). En el presente trabajo, se sintetiza carbutamida (1-butil-3-sulfanililurea; BZ-55; U 6987; Nadisan; Invenol; Oranil; Bucarban) marcada en el grupo sulfonamido de la molécula con  $^{35}\text{S}$  y se estudian diversos aspectos del metabolismo y farmacodinamia del compuesto en ratas, fundamentalmente, relacionados con su distribución y eliminación. El análisis farmacodinámico se completa con un estudio histoquímico en el que la molécula marcada brinda asimismo excepcionales posibilidades de localización del fármaco o sus metabolitos a nivel histológico, por métodos autorradiográficos. Todo ello permite llegar a establecer conclusiones precisas respecto a la farmacología del compuesto y discutir nuevos aspectos dentro de la compleja interpretación del mecanismo de acción terapéutica de las sulfonilureas.

Previamente se resumen los aspectos más significativos dentro de la densa información acumulada sobre este tema en los últimos años, lo cual permite establecer la situación del problema y los puntos de interés que serán objeto de estudio.

### 1.1. LAS SULFONILUREAS HIPOGLUCEMIANTES.

Al pretender realizar un análisis de la bibliografía referente a la carbutamida, no es posible considerarla con independencia de toda una serie de compuestos estructuralmente relacionados con la misma, en general sulfonilureas y sulfamidotiodiazoles, cuyo descubrimiento y aplicación clínica al tratamiento peroral de determinados trastornos diabéticos, constituye sin duda un importante capítulo de la química farmacéutica. Desde que en 1942, investigando la acción antibacteriana del 2-(sulfanilamido)-5-isopropiltiodiazol (2254 RP, IPTD), se descubrió el severo y prolongado efecto hipoglucémico de este compuesto (2), se desarrolla una intensa investigación, por una parte, en torno a sus posibilidades de aplicación terapéutica y, por otra, en la preparación por síntesis química de compuestos estructuralmente relacionados con el mismo, así como el establecimiento de una posible correlación entre la estructura química de diferentes sulfonamidas y la intensidad de su acción hipoglucemiante. Hacia 1.955, se comienzan a publicar los resultados obtenidos con carbutamida (3, 4, 5), que muestra en animales una acción hipoglucemiante más acusada que el sulfanilamido-isopropiltiodiazol citado. Al igual que éste, la carbutamida posee un grupo  $\text{-NH}_2$  en posición p- del

anillo bencénico, lo cual le confiere a su vez un leve carácter bacteriostático. En 1.956 se publican (6) los resultados obtenidos con tolbutamida (1-butil-3-(p-tolilsulfonil)urea; D 860; Rastinon; Orinase; Orabet; Artosin), estructuralmente idéntico a la carbutamida, con similar acción hipoglucemiante pero contando con la ventaja de carecer de efectos bacteriostáticos, al sustituirse el grupo  $-NH_2$  por un grupo  $-CH_3$ .

Desde esta fecha hasta la actualidad, cabe suponer, en la opinión de Bänder (7), que se han sintetizado más de 12.000 compuestos que, de acuerdo con su estructura química, deberían tener acción hipoglucemiante y, en efecto, en el 70-80 % de los mismos se ha encontrado capacidad para disminuir los niveles de glucosa en sangre. No obstante, pocos de ellos, además de la carbutamida y tolbutamida ya mencionados, se han llegado a aplicar a la terapia en humanos (8). Podemos citar, entre los más utilizados, la clorpropamida (1-(p-clorofenilsulfonil)-3-propilurea) y la metaexamida (1-ciclohexil-3-(4-metilmetanilil)urea).

Un hecho se puso pronto de manifiesto en la aplicación clínica de este tipo de compuestos: son efectivos en la diabetes en adultos, con actividad insulínica disminuída y sin cetosis, mientras que son en general ineficaces en la diabetes juvenil grave, en la

que no hay producción de insulina y se presenta intensa cetosis. En experiencias con animales, realizadas en 1.944, Loubatières (8) demostraba que el sulfanilamido-isopropiltiodiazol es inefectivo en perros pancreatectomizados y postulaba, que la acción de este compuesto en animales normales se ejerce a través de una estimulación de la secreción insulínica, siendo necesario un mínimo de la actividad de la glándula endocrina pancreática, para obtener una respuesta terapéutica; análogos resultados experimentales se encontraron con carbutamida (3) y tolbutamida (6). Una intensa investigación sobre la determinación del posible mecanismo de acción de estos compuestos, llevó a la conclusión casi unánime de que se trataba de sustancias capaces de estimular la secreción de insulina en las células beta del páncreas. Sin embargo, hallazgos posteriores han demostrado que no es éste el único mecanismo de la acción hipoglucemiante de las sulfonilureas. Ya en 1.957, Root (9) demostraba que "en animales aloxan-diabéticos o pancreatectomizados, la carbutamida es capaz de hacer descender los niveles de glucosa en sangre si previamente, dentro de un período inferior a 18 horas, se les ha administrado insulina". Igualmente señalaba que "en estos animales, si se administran simultáneamente insulina y carbutamida, el descenso de la glucosa en sangre y de la excretada en orina, es mayor que el producido



por la misma dosis de insulina en ausencia de carbutamida". Estos resultados sugerían ya que la "potenciación" de la insulina podría ser otra de las formas de actuación de las sulfonilureas hipoglucemiantes. Sobre estas directrices se ha acumulado en los últimos años una enorme base experimental, destinada a conocer el alcance de estos compuestos en cuanto a su aplicación clínica y, de manera particular, al intento de aclarar sus posibles mecanismos de actuación. Los resultados son a menudo contradictorios, sin que hasta el momento se haya llegado a conclusiones unánimes y definitivas en muchos puntos. Sobre ello insistiremos en este mismo capítulo.

Otro aspecto que es preciso señalar es el de las posibles diferencias en el efecto hipoglucemiante a que dan lugar diferentes sulfonilureas, dependiendo de su estructura química y su metabolismo en diferentes especies animales (10). A este respecto, sólo dentro de ciertos límites cabe extraer conclusiones de tipo general sobre su mecanismo de acción y por supuesto, todavía se ha de concretar más, refiriéndose a un determinado compuesto y a una determinada especie cuando se trata de datos de tipo farmacológico. Por ejemplo, es significativo el hecho de que la carbutamida, que se metaboliza fisiológicamente a N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida en mayor o menor grado según las especies (10), tiene un

efecto hipoglucémico transitorio en conejo (11), cuya capacidad de acetilación del compuesto es máxima, como consecuencia de que el derivado acetilado es inactivo. Por el contrario, el efecto hipoglucémico es máximo en perro, que acetila la carbutamida en grado mínimo. Igualmente, la mayor o menor capacidad para metabolizar el fármaco, condiciona la disponibilidad del mismo después de su administración y su velocidad de eliminación. Todo ello conduce a la necesidad de determinar para cada compuesto y para cada especie animal, los parámetros farmacodinámicos de absorción, distribución, acumulación, metabolismo y eliminación del mismo. A este respecto, resumimos a continuación los datos encontrados en la bibliografía referentes a la farmacología de la carbutamida y, seguidamente, los que se refieren a los diferentes mecanismos propuestos para explicar la acción hipoglucemiante de este compuesto y sus análogos estructurales. Una interesante revisión de estos temas, dedicada a las sulfonilureas de mayor aplicación clínica, ha sido recientemente realizada por Pfeiffer, Schoffling, Ditschuneit y Ziegler (12), con referencia asimismo a las sulfonilureas hipoglucemiantes de recientes descubrimientos. A este trabajo remitimos para una más completa información sobre dichas materias.

## 1.2. DATOS FARMACOLOGICOS

### 1.2.1. Absorción.

Una característica importante, tanto de la carbutamida como de la tolbutamida, es su fácil e inmediata absorción en intestino, donde pasan a la forma de sal sódica (14). La carbutamida se excreta en bilis, pero es reabsorbida casi completamente en el intestino, encontrándose sólo pequeñas cantidades en heces (15, 16).

### 1.2.2 Niveles hemáticos y su relación con la actividad hipoglucémica.

Resulta en cierto modo sorprendente la larga vida biológica de la carbutamida, que oscila entre 30 y 60 horas en hombre (17), frente a la correspondiente por ejemplo a tolbutamida, que alcanza sólo las 4-8 horas en el hombre (17, 18) y las 10-20 horas en perro (14). En conejos se encuentra una buena concordancia entre la cantidad de carbutamida administrada y el descenso del nivel de glucemia, para dosis intravenosas comprendidas entre 0'05 y 0'25 g/Kg de peso corporal. La misma correlación se observa en ratas para dosis orales entre 0'05 y 0'15 g/Kg (4, 14, 18). Dosis menores no tienen efecto hipoglucémico y dosis

mayores no incrementan significativamente el descenso de glucemia, muchas veces debido a la toxicidad del fármaco, o a estimulación de la médula adrenal (20), hasta el punto de que dosis altas por vía intravenosa, o dosis extremadamente elevadas (4 g/Kg) por vía oral, producen incluso hiperglucemia (4). Pueden considerarse como dosis límites con efecto terapéutico por vía intravenosa, las siguientes (4): 2 g en personas, 0'1 g/Kg en perros y 0'25 g/Kg en conejos. En diabéticos, una dosis única de carbutamida reduce normalmente la concentración de azúcar en sangre a niveles satisfactorios durante 24 horas (12).

Como ya se ha señalado, la duración del efecto hipoglucémico depende de la velocidad de acetilación y excreción de la carbutamida. Así, por ejemplo en conejo, la respuesta es corta como consecuencia de la rápida acetilación y excreción del compuesto; sin duda, el proceso de acetilación facilita el transporte renal activo y, en consecuencia, la eliminación del fármaco (21).

### 1.2.3. Distribución.

Para la determinación cuantitativa de carbutamida en tejidos y fluidos biológicos, se

ha utilizado, de forma general, el método clásico de Bratton y Marshall (22) o alguna de sus modificaciones (23, 24, 25), según el cual, la sulfonamida se convierte en el correspondiente diazocompuesto, que se copula con un reactivo adecuado y se determina por colorimetría.

Se ha estudiado (26) la distribución de carbutamida en ratas a las que se administran dosis de 300 mg/Kg, encontrándose, a las 4 horas, trazas de cerebro y concentraciones relativamente altas en hígado, músculo y páncreas. La distribución relativa en diferentes fracciones de homogenado de hígado es la siguiente: membrana celular y núcleos, 25 %; mitocondrias, 12 %; fracción residual 63 %; por autorradiografía, utilizando carbutamida tritiada, se ha confirmado su distribución intracelular en páncreas e hígado.

Concentraciones importantes de carbutamida se detectan en bilis (27, 28) en diferentes especies animales.

#### 1.2.4. Metabolismo y excreción.

La carbutamida se metaboliza fisiológicamente a N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida, en grado variable según las especies. Scholz y Häussler (10) esta-

blecen la siguiente secuencia en cuanto a magnitud del proceso de acetilación:

conejo > cobaya > hombre > rata > mono > perro

La extensión del proceso de acetilación está, como ya se ha dicho, en relación con la velocidad de eliminación de la carbutamida y la duración del efecto hipoglucémico. La eliminación de la carbutamida por riñón es relativamente lenta en general, si se compara con otras sulfonilureas. En hombre, un 30-50 % aparece en forma acetilada en orina (29) y tarda hasta 17 días en ser completamente eliminada. La depuración renal en perro es de  $2.9 \text{ ml/min.m}^2$ , lo que supone una reabsorción del 96 % (30).

### 1.3. MECANISMO DE ACCION.

Se hace a continuación referencia a observaciones de tipo experimental relacionadas con el modo de acción de las dos sulfonilureas más investigadas, carbutamida y tolbutamida, dejando aparte en su mayoría, las observaciones de tipo clínico, por estimar que quedan un tanto al margen de la orientación de este trabajo. De nuevo remitimos a la revisión de Pfeiffer y colabs. (12) para una más completa información sobre

ambos aspectos.

Sin duda, la interpretación del mecanismo de actuación de las sulfonilureas hipoglucemiantes gira en torno al hecho, ya señalado y del cual hay evidencia inequívoca, de que estos compuestos son ineficaces en animales pancreatectomizados, sean perro (31, 32, 33) rata (34, 35) o gato (36). Innumerables observaciones en este sentido, confirman la hipótesis apuntada ya en 1.944 por Loubatières, de que las sulfonilureas requieren para su respuesta terapéutica la concurrencia de un mínimo de actividad funcional del tejido insular pancreático. La presencia de sólo la décima parte del páncreas, es suficiente para dar lugar a respuesta hipoglucémica en perros (37, 38). Igualmente, en experiencias con animales aloxan-diabéticos, tanto perro (15, 39, 40) como conejo (41, 42, 43) y rata (44, 45, 46), no hay respuesta hipoglucémica a las sulfonilureas. Por el contrario, en animales incompletamente o parcialmente aloxanizados, con hiperglucemia suave, pero sin cetonemia, estos compuestos dan lugar a reducción de la glucemia (4, 42, 44, 46, 47). La acción de estos compuestos parece, según todas las evidencias, que es mediada por la insulina y por lo tanto, cabe interpretarla como una influencia sobre los sistemas responsables directamente o que modulan la producción, secreción o utilización de la

hormona. Resumimos a continuación brevemente las bases experimentales en apoyo de las diferentes hipótesis relacionadas con el mecanismo de acción de las sulfonilureas, las cuales en términos generales y a la luz de las últimas investigaciones en este campo, pueden agruparse en tres apartados, que se refieren respectivamente a la acción de las sulfonilureas sobre la secreción insulínica, acción sobre el metabolismo hepático e influencia sobre el metabolismo hidrocarbonado en tejidos periféricos.

#### 1.3.1. Estimulación de la secreción insulínica.

##### 1.3.1.1. Cambios morfológicos.

Datos de tipo citológico, histológico e histoquímico apoyan la hipótesis de una estimulación de la secreción insulínica por parte de las sulfonilureas hipoglucemiantes (12). Una degranulación marcada de las células beta de los islotes de Langerhans, después de administrar carbutamida o tolbutamida, se ha demostrado en perro y conejo (48, 49, 50, 51). En perros y ratas el efecto se manifiesta al poco tiempo de administrar el fármaco, mientras que en conejo, tiene lugar sólo después de varios días de



tratamiento. Por microscopía electrónica se confirma igualmente la degranulación de las células beta en rata, conejo y cobaya (49, 52, 53). En rata y conejo, los gránulos secretorios están contenidos en sacos membranosos, los cuales después del tratamiento con las sulfonilureas mencionadas, se desplazan hacia la membrana celular, proceso conocido con el nombre de emiocitosis (52). En cobaya se observa incluso disolución de la membrana de los sáculos y liberación de los granos de secreción dentro del citoplasma (53).

En cuanto a alteraciones de tipo histológico, se ha puesto de manifiesto en ratas un incremento en la masa total del tejido insular, después de tratamientos prolongados con carbutamida (54), debido a hipertrofia de las células beta, multiplicación mitótica de las mismas o posiblemente también, a un proceso de transformación acino-insular. El contenido pancreático en insulina se ha medido, antes y después de la administración de sulfonilureas, en diferentes especies animales, concluyéndose que "las sulfonilureas estimulan la liberación de las reservas de insulina presentes en

forma soluble y fácilmente asequible; esta fase es seguida por la movilización de la insulina ligada a los gránulos y la regeneración de nueva insulina, por síntesis, durante el tratamiento continuado, como consecuencia de cada nueva administración" (12).

Sobre los anteriores datos experimentales debe hacerse a nuestro juicio la observación, de que las alteraciones morfológicas encontradas en el tejido insular pancreático, son resultado de tratamientos agudos, prolongados o crónicos con sulfonilureas y, en generalm sólo al cabo de algún tiempo de tratamiento se detectan las alteraciones mencionadas.

#### 1.3.1.2. Estudios "in vitro".

En condiciones "in vitro", se ha estudiado ampliamente la secreción de insulina en respuesta a las sulfonilureas hipoglucemiantes, tanto por parte de cortes de tejido pancreático, como mediante la técnica de perfusión de páncreas aislado.

Los resultados de la incubación de

tejido pancreático de rata o conejo, en medios a los que se ha añadido carbutamida o tolbutamida, están en favor de una estimulación de la secreción de insulina al medio de incubación (55,56,57) aunque, en la opinión de algunos (58, 59), la liberación de insulina "in vitro" no es equiparable a la secreción "in vivo", tratándose simplemente de una movilización de pequeñas cantidades de insulina soluble en el citoplasma. Por el contrario, experiencias "in vitro" del mismo tipo, realizadas con tejido pancreático de pato, dan como resultado una carencia de secreción insulínica como respuesta a la tolbutamida (60, 61) lo cual refleja la menor participación del páncreas en el metabolismo de la glucosa en estos animales (12). Recientemente, en experiencias realizadas con islotes de Langerhans aislados de páncreas de rata, no se ha encontrado estimulación de la secreción insulínica como respuesta a la tolbutamida, mientras que se observan en cambio, resultados positivos con islotes procedentes de conejo, en las mismas condiciones de incubación (62).

Estudios realizados mediante perfusión de páncreas aislado, han puesto de manifiesto la estimulación de la secreción insulínica por parte de tolbutamida y carbutamida en perro (63) y por la tolbutamida en rata (64, 65, 66). Las cantidades de insulina liberadas en respuesta a la carbutamida en perro, son del mismo orden que las segregadas en respuesta a la glucosa. Como conclusión a diferentes experiencias de este tipo, se establece que la acción estimulante de la secreción insulínica producida por la tolbutamida "in vitro", no requiere la presencia de glucosa en el medio de incubación (57, 64, 65, 66, 67, 68, 69). Sin embargo, hay que destacar, que esta estimulación en ausencia de glucosa es transitoria y de una duración muy inferior a la vida media biológica del compuesto. En oposición a estas conclusiones, Cerasi y colabs. (70), han puesto de manifiesto recientemente en experiencias "in vivo", la influencia de los niveles de glucosa en la acción insulino-secretores de la tolbutamida. Experiencias en humanos han demostrado que "la tolbutamida, junto a la acción transitoria inicial, es

capaz de mantener una estimulación prolongada de la liberación de insulina, siempre que los niveles de glucemia se mantengan dentro de los valores normales. Esto implica que, "o bien el efecto de la tolbutamida sobre las células beta depende de la glucosa o un metabolito de la glucosa o, por el contrario, un efecto insulino-secretor de la tolbutamida, independiente de la glucosa, es inhibido por la hipoglucemia subsiguiente a la administración del fármaco". La primera posibilidad no está en contra de los resultados apuntados anteriormente (64, 65, 66), toda vez que la estimulación de tipo transitorio de la secreción insulínica provocada por la tolbutamida en ausencia de glucosa añadida al medio en las experiencias "in vitro", puede atribuirse a glucosa generada en el propio tejido a partir de glucógeno, en el que las células beta son relativamente ricas (71, 72), glucosa que participaría así en la acción de la tolbutamida en esta primera etapa. En cuanto a la segunda posibilidad, una estimulación de la secreción insulínica independiente de la glucosa, queda parcialmente excluida en

la opinión de Cerasi y colabs. (70), por el hecho de que la tolbutamida, "in vitro" y en ausencia de glucosa en el medio, no es capaz de producir más que la estimulación inicial y transitoria. Como resultado de estas experiencias, se deduce, que los niveles de glucosa en sangre tienen evidente significación en la acción insulino-secreto-  
ra de la tolbutamida. La respuesta de la secreción de insulina a un aumento de la glucemia, resulta fuertemente intensificada por una previa administración de tolbutamida.

El mecanismo por el cual las sulfonilureas son capaces de estimular la secreción de insulina al aumentar los niveles de glucosa, permanece desconocido. La idea apuntada con las primeras investigaciones sobre estos compuestos según la cual "la concentración de sulfonamida en contacto con las células de los islotes de Langerhans es el factor responsable de la liberación de insulina" (38), no esta sustentada suficientemente, pese a los hechos experimentales que no obstante demuestran su

acción insulino-secretora.

El mismo mecanismo por el cual la glucosa estimula la secreción insulínica, no está aclarado satisfactoriamente, aunque evidencias experimentales sugieren que un metabolito intermediario, más bien que la propia glucosa, sea el responsable de la secreción de insulina en las células beta (73, 74). Como es sabido, el xilitol es capaz de estimular la secreción de insulina, tanto en animal completo (75), como en páncreas perfundido (76) o en islotes de Langerhans aislados de rata (77). Igualmente, en este último tipo de preparación, el ribitol y la ribosa se revelan tan efectivos en la estimulación insulino-secretora como la propia glucosa, e incluso, el xilitol es más efectivo que ésta (77). Se ha demostrado por otra parte, que otros alcoholes polihídricos, tales como el arabitól, sorbitol y manitol y pentosas, tales como xilosa y arabinosa, no tienen efecto sobre la secreción insulínica (78). Es importante a este respecto el hecho señalado por Montague y cols. (77), de que ninguno de estos polialcoholes o pentosas se metaboliza a través

de la ruta pentosa fosfato en tejidos de mamíferos (79) mientras que los tres compuestos, ribosa, ribitol y xilitol, que son capaces de estimular la secreción de insulina, se metabolizan según esta vía (79). Se ha demostrado por otra parte (77) que la epinefrina es capaz de inhibir la secreción de insulina causada, tanto por xilitol como por glucosa, en islotes aislados y los mismos resultados se obtienen "in vivo" en perro y mono (80), lo cual parece indicar, que ambas sustancias son efectivas a través de un mecanismo de acción sensible a la epinefrina. Estos y otros resultados sugieren una implicación de la ruta metabólica pentosa fosfato en la estimulación de la secreción insulínica y, en la opinión de Montague y cols, el mecanismo por el que la glucosa estimula la secreción insulínica, puede suponer una previa metabolización de la glucosa por la ruta de pentosa fosfato, siendo un metabolito posterior en esta vía el que afecta a la secreción de insulina. Hay evidencia de que las últimas etapas del mecanismo de secreción pueden llevar implícita la síntesis y ruptura de AMP cíclico



(81, 82) y es posible que una pentosa o un derivado de una pentosa, regule la concentración intracelular de esta sustancia.

Ante la complejidad del mecanismo de estimulación de la secreción insulínica, es difícil predecir, con la base experimental de que se dispone, a que nivel puedan actuar las sulfonilureas hipoglucemiantes aunque, si la acción insulino-secretora de las sulfonilureas está en relación con los niveles de glucosa, tal como Cerasi y colabs. ponen de manifiesto, puede pensarse que estos compuestos actúen a nivel de alguna de las etapas de la secuencia propuesta por Montague y colabs. como probable mecanismo de estimulación por parte de la glucosa.

#### 1.3.1.3. Estudios "in vivo".

Diferentes tipos de experiencias "in vivo" se han llevado a cabo con el fin de detectar la posible capacidad de estimulación de la secreción insulínica por parte de las sulfonilureas hipoglucemiantes. En humanos se ha demostrado dicha capacidad (83) y se ha comparado con la correspondiente

a la glucosa. En el mismo sentido, en una reciente publicación (80) se compara la capacidad insulino-secretora de tolbutamida, glucosa y xilitol, en perro y mono, encontrándose estimulación por parte de las tres sustancias aunque en diferente grado para cada una de ellas, según la especie.

En diferentes preparaciones animales, se ha medido la actividad insulínica, tanto a nivel de la vena porta, como de la vena pancreático-duodenal, encontrándose resultados discordantes desde el punto de vista cuantitativo, aunque cualitativamente se detectan en general incrementos en los niveles de insulina, en respuesta a las sulfonilureas. No se encuentran, sin embargo, incrementos en la circulación general, lo que conduce a la suposición de que la mayor parte de la insulina liberada, es bloqueada e inactivada en hígado (12). Experiencias en perros, en las que el flujo sanguíneo pancreático se lleva directamente a la circulación general (shunt vena pancreático-duodenal - vena yugular) han mostrado que la administración intravenosa de 100 mg/Kg de

tolbutamida, da lugar a un incremento inmediato y prolongado de actividad insulínica en la circulación general (84).

En resumen, puede decirse que las sulfonilureas que estamos tratando muestran una capacidad para estimular la secreción insulínica, que ha sido medida en preparaciones "in vitro" de tejido pancreático y en páncreas aislado y perfundido, así como en preparaciones "in vivo", a nivel de las venas porta y pancreática.

Por el contrario, en preparaciones de islotes de Langerhans aislados de rata, incubados in vitro, la tolbutamida concretamente, no es capaz de estimular la secreción de insulina (62) si bien, en las mismas condiciones experimentales, se encuentra estimulación con tejido procedente de conejo. Estos últimos resultados ponen en duda la existencia de un receptor específico para la acción de las sulfonilureas a nivel de las células beta pancreáticas, o al menos, la estimulación de la secreción insulínica no parece ser el único mecanismo de actuación de estos compuestos.

### 1.3.2. Influencia de las sulfonilureas hipoglucemiantes a nivel hepático.

Frente a las numerosas evidencias en favor de una estimulación de la secreción insulínica por parte de las sulfonilureas, no debe olvidarse el hecho ya señalado, de que la carbutamida hace descender la glucemia en animales pancreatectomizados o aloxan-diabéticos, simultáneamente, dentro de un período inferior a 18 horas, se ha administrado insulina (9), lo cual sugiere que, si bien la estimulación insulino-secretora puede ser uno de los mecanismos de acción de las sulfonilureas, debe considerarse la posibilidad de otras influencias de tipo extrapancreático, aunque mediadas siempre por la insulina.

La experimentación llevada a cabo en este sentido ha conducido a resultados discordantes con respecto a la significación relativa de dos posibles mecanismos de acción hipoglucemiante: uno a nivel hepático y otro a nivel de la utilización de glucosa en tejidos periféricos.

La posibilidad de una acción de las

sulfonilureas sobre el metabolismo hepático, ha sido considerada ampliamente. Debe hacerse ya notar en principio, que la hipoglucemia causada por las sulfonilureas no es abolida por hepatectomía (85). Por otra parte, en animales hepatectomizados, la hipoglucemia va acompañada de un incremento en la utilización periférica de glucosa, efecto similar al inducido por una infusión continua de insulina (86).

Una consecuencia importante del tratamiento con sulfonilureas es un marcado incremento del glucógeno hepático, Sin embargo, ni la inhibición de la glucogenolisis, ni la estimulación de la glucogénesis por acción de estos compuestos, se ha demostrado con entera validez. En diferentes trabajos se describe una inhibición de la glucosa-6-fosfatasa por parte de las sulfonilureas (87, 88, 89), si bien la interpretación de estos resultados es difícil si se tiene en cuenta que la misma inhibición es causada por sulfonamidas y sulfonilureas que no tienen acción hipoglucemiante. Tampoco puede excluirse la posibilidad de que la inhibición de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa se deba indirectamente a la estimulación de la secreción insulínica. En efecto, no

se produce incremento en los niveles de glucógeno cuando se trata de animales pancreatectomizados o aloxan-diabéticos totales (90).

En cuanto a una posible estimulación de la glucogénesis, después del tratamiento con sulfonilureas se ha detectado un incremento en la incorporación de glucosa marcada al glucógeno hepático, con o sin aumento de éste (91), aunque de nuevo cabe preguntarse si este efecto no será consecuencia del incremento de actividad insulínica provocada por estos compuestos. En cualquier caso, el incremento en los niveles de glucógeno hepático sólo se han detectado de forma significativa (88) después de un tratamiento crónico con sulfonilureas y no parece que pueda explicar, por sí sólo, la hipoglucemia causada por estas sustancias.

El estudio de una posible influencia sobre el consumo o sobre la liberación de glucosa por el hígado, ha conducido a resultados discordantes. En experiencias en perros provistos de catéteres en las venas portal y hepática, después de la administración intraportal de tolbutamida, se ha demostrado una

rápida y prolongada supresión en el flujo neto de glucosa a la salida del hígado, pero, e como en casos anteriores, la mayor parte de los resultados que sugieren una acción hepática de las sulfonilureas, pueden ser fácilmente explicados como consecuencia de un aumento en la disponibilidad de insulina provocada por estos compuestos.

### 1.3.3. Efectos de las sulfonilureas en tejidos periféricos.

Un posible mecanismo de acción periférica de las sulfonilureas, ha sido tratado y estudiado en numerosas experiencias "in vitro", destinadas a demostrar en el tejido muscular y en el adiposo, una estimulación de la incorporación y consumo de glucosa y a determinar la influencia de las sulfonilureas en el efecto de la insulina sobre estos procesos. Aunque las primeras investigaciones en este sentido condujeron a resultados conflictivos, recientes trabajos con sistemas "in vitro" perfeccionados, atraen de nuevo la atención sobre este campo.

Estudios realizados con diafragma de rata, demuestran un incremento en la incorporación de glucosa cuando hay carbutamida presente en el medio de incubación (92), aunque los mismos investigadores encuentran resultados idénticos con animales aloxan-diabéticos (93). Igualmente, la incorporación de glucosa por hemidiafragmas de ratas a las que se ha administrado previamente carbutamida por vía intraperitoneal, aumenta en un 20% sobre el control, resultando asimismo incrementada la incorporación de D-galactosa y D-fructuosa pero no la de D-arabinosa (94). Resultados positivos se han encontrado igualmente en diafragmas pretratados con sulfonilureas (95), aunque por el contrario, se ha descrito en las mismas condiciones, una carencia de estimulación (96). Un acuerdo más unánime parece existir en el hecho de que las sulfonilureas no incrementan los niveles de glucógeno en músculo, lo cual puede explicarse postulando una inmediata utilización de la glucosa incorporada.

En tejido adiposo se han descrito también resultados contradictorios en lo que se refiere a la incorporación o la oxidación



de glucosa "in vitro" (97).

En una reciente publicación, Feldman y Lebovitz (98) describen experiencias realizadas en diafragma aislado de ratón, con el fin de estudiar la influencia de la tolbutamida sobre el sistema de transporte de azúcares en el músculo esquelético, midiendo la incorporación de 2-desoxiglucosa (2-DG). Los resultados de estas experiencias muestran que el transporte de 2-DG mediado por insulina, resulta significativamente incrementado cuando la preparación "in vitro" procede de animales que han recibido un tratamiento subagudo o crónico de tolbutamida y además, hay tolbutamida presente en el medio de preincubación e incubación. Esta potenciación del transporte "in vitro" de 2-DG en músculo, se produce a concentraciones fisiológicas de insulina ( $26 \mu\text{U/ml}$ ) y niveles terapéuticos normales de tolbutamida ( $0.2 \text{ mg/ml}$ ), concluyéndose que la potenciación de la acción de la insulina en el sistema de transporte de azúcares en músculo esquelético, puede ser uno de los más importantes efectos de la terapia con tolbutamida.

Como conclusión al análisis bibliográfico realizado en torno al mecanismo de acción de las sulfonilureas hipoglucemiantes, puede decirse que, a falta de una unanimidad de criterio, las evidencias experimentales más consistentes están, o bien en favor de una estimulación de la secreción insulínica en las células beta, o por el contrario, de una potenciación de la insulina en la acción de esta hormona sobre el metabolismo hidrocarbonado en tejidos periféricos. En consecuencia, se pretende en el presente trabajo aportar nuevos datos sobre el problema, referidos en particular a la carbutamida, los cuales, dentro de ciertos límites, pueden hacerse extensibles a las sulfonilureas estructuralmente relacionadas con la carbutamida a las que nos hemos venido refiriendo en la revisión bibliográfica precedente.

#### 1.4. PLAN DE TRABAJO.

Las ideas expuestas hasta ahora, permiten plantear la línea a seguir en el estudio farmacológico de la carbutamida en ratas, que puede dividirse en dos partes: una de ellas dedicada a la obtención de datos sobre la farmacodinamia y metabolismo del compuesto en esta especie animal y, una segunda, en la que se aportan nuevas bases experimentales que permiten abordar la discusión del mecanismo de acción hipoglucemiante de este compuesto.

Dentro de la parte dedicada a farmacología de la carbutamida, se presentan como puntos importantes a esclarecer, los que se refieren a la localización histológica del proceso de transformación metabólica del compuesto en su derivado acetilado (inactivo desde el punto de vista terapéutico) y la extensión en que tiene lugar dicho proceso metabólico, factor que, como se ha dicho condiciona por una parte la duración del efecto hipoglucemiante y por otra, el tiempo de eliminación fisiológica del fármaco. Asimismo, el estudio del mecanismo de eliminación permitirá explicar la larga vida biológica de la carbutamida en comparación con otras sulfonilureas estructuralmente semejantes.

En cuanto a la elucidación del mecanismo de acción hipoglucemiante de la carbutamida, se propone, a la vista de la revisión bibliográfica realizada, el estudio, por

-32-

métodos autorradiográficos, de la posible localización y fijación de la carbutamida-<sup>35</sup>S en el tejido insular pancreático de rata, lo cual sería un importante dato a favor de la hipótesis de una estimulación de la secreción insulínica a nivel de las células beta pancreáticas, al menos en esta especie animal. Igualmente, sobre la base de la hipótesis de una acción periférica de la carbutamida, concretamente, sobre su posible influencia en el transporte e incorporación de glucosa en la célula muscular estriada, se proyecta un estudio microautorradiográfico de este tipo de tejido en animales tratados con carbutamida marcada.

La experimentación en animales según las directrices apuntadas, utilizando carbutamida-<sup>35</sup>S, ha significado la necesidad de poner a punto métodos radioquímicos de medida de <sup>35</sup>S en materiales de origen animal diverso y técnicas de microautorradiografía de secciones histológicas, así como la preparación de carbutamida-<sup>35</sup>S en las condiciones de actividad específica requeridas. En definitiva, el trabajo se ha desarrollado según las siguientes etapas:

a) Parte experimental previa.

- Determinación de las condiciones de medida por centelleo líquido de <sup>35</sup>S en muestras de origen animal.

- Estudio de las correcciones en las medidas y correlación de resultados.
- Puesta a punto de la técnica de microautorradiografía de secciones histológicas.

b) Síntesis orgánica.

- Síntesis de carbutamida-<sup>35</sup>S. Determinaciones de pureza química y radioquímica.
- Síntesis de N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida. Identificación y control de pureza.

c) Experimentación en animales.

- Distribución de niveles de carbutamida-<sup>35</sup>S en diferentes órganos y tejidos de rata, después de la administración de diferentes dosis de fármaco. Variación en el tiempo de dicha distribución.
- Cinética de eliminación fisiológica de carbutamida-<sup>35</sup>S.
- Metabolismo de la carbutamida en ratas.
- Estudio microautorradiográfico de la localización de carbutamida-<sup>35</sup>S en tejidos hepático y renal.
- Mecanismo de eliminación renal de carbutamida.
- Estudio microautorradiográfico de la localización de carbutamida-<sup>35</sup>S en tejido pancreático.

- Estudio microautorradiográfico de la localización de carbutamida-<sup>35</sup>S en tejido muscular estriado.

## 2. TECNICAS Y METODOS DE TRABAJO.

## 2. TECNICAS Y METODOS DE TRABAJO.

### 2.1. TECNICAS RADIOMETRICAS.

#### 2.1.1. Contaje por centelleo líquido de $^{35}\text{S}$

##### 2.1.1.1. Aspectos generales.

El  $^{35}\text{S}$  es un emisor beta cuyo espectro continuo de energías, tiene un valor máximo de 0'17 Mev. Su período de semidesintegración es de 87'1 días, relativamente corto por lo tanto, si se compara con los correspondientes a los dos emisores beta más utilizados en estudios bioquímicos, el  $^3\text{H}$ , (12'3 años) y el  $^{14}\text{C}$  (5.700 años). En consecuencia, es preciso realizar correcciones por "decay" con el fin de tener resultados siempre comparativos. En la TABLA I se da el tanto por ciento de actividad remanente de una dosis, en función del tiempo, a lo largo de un semiperíodo.



TABLA I. Desintegración del  $^{35}\text{S}$ . La radiactividad remanente se expresa como tanto por ciento del valor inicial.

Días	% Remanente	Días	% Remanente
1	99'2	45	69'99
3	97'65	47	68'87
5	96'11	49	67'78
7	94'58	51	66'73
9	93'10	53	65'68
11	91'67	55	64'64
13	90'20	57	63'67
15	88'78	59	62'64
17	87'38	61	61'66
19	86'00	63	60'66
21	84'65	65	59'71
23	83'30	67	58'75
25	81'98	69	57'85
27	80'70	71	56'99
29	79'44	73	56'02
31	78'20	75	55'15
33	76'99	77	54'27
35	75'76	79	53'46
37	74'58	81	52'61
39	73'42	83	51'77
41	72'26	85	50'94
43	71'09	87	50'02

Las características del  $^{35}\text{S}$ , en cuanto a energía de su partícula beta se refiere, lo hacen apto para ser medido por centelleo líquido con eficiencia satisfactoria. A lo largo del presente trabajo se ha utilizado para su medida, un equipo de conteo por centelleo líquido, modelo "Tri-Carb Spectrometer Serie 314 E" de la firma Packard Instrument Company, Inc. No entramos en la descripción del fundamento del conteo por centelleo líquido, ni de la instrumentación necesaria, por ser sobradamente conocidos (99). En cuanto a la preparación de las muestras de conteo, la solución centelleadora utilizada en todas las medidas ha sido la integrada por:

PPO (2,5-difeniloxazol), como centelleador	
primario .....	5 g
POPOP (2-p-fenilenbis-(5-feniloxazol), como	
centelleador secundario .....	0'3 g
TOLUENO, como disolvente .....	1000 ml.

Eventualmente se ha utilizado también, para la medida de muestras acuosas, una solución centelleadora cuyo disolvente es una mezcla tolueno-etanol absoluto, (6:4).

#### 2.1.1.2. Determinación de las condiciones óptimas y la eficiencia del contaje.

Se determinan las condiciones óptimas de voltaje en los fotomultiplicadores, con el fin de obtener con el equipo, los valores máximos de contaje para el  $^{35}\text{S}$ . El intervalo de voltaje aplicable está situado entre los 650 y los 1500 V. El ajuste se realiza mediante un conmutador de 10 posiciones, que hace variar la tensión en etapas de 85 V, y un potenciómetro de 10 vueltas, para el ajuste fino, que varía la tensión en 8'5 V por cada vuelta completa.

Con una "anchura de ventana" de 10 a 70, y una ganancia en los amplificadores de 10 (valor máximo), se determinan los valores de cpm corregidas por fondo, dados por una misma muestra de  $^{35}\text{S}$ , en función del voltaje aplicado. Los resultados se representan en la FIG. 1. Puede observarse, que el número de cpm es máximo cuando la posición del conmutador y el potenciómetro es 3'40, que corresponde a una tensión de 940 V, valor que se ha mantenido en todas las medidas de  $^{35}\text{S}$ .

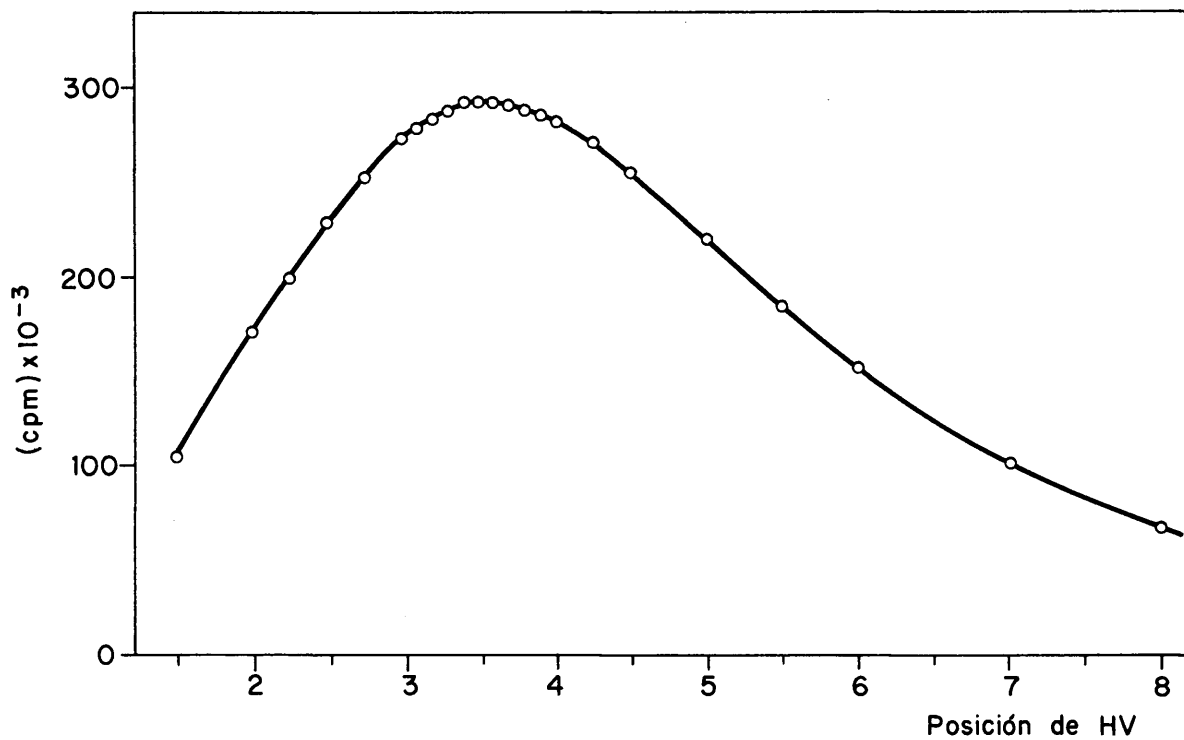


FIG.1.—DETERMINACION DEL VOLTAJE DE OPERACION .

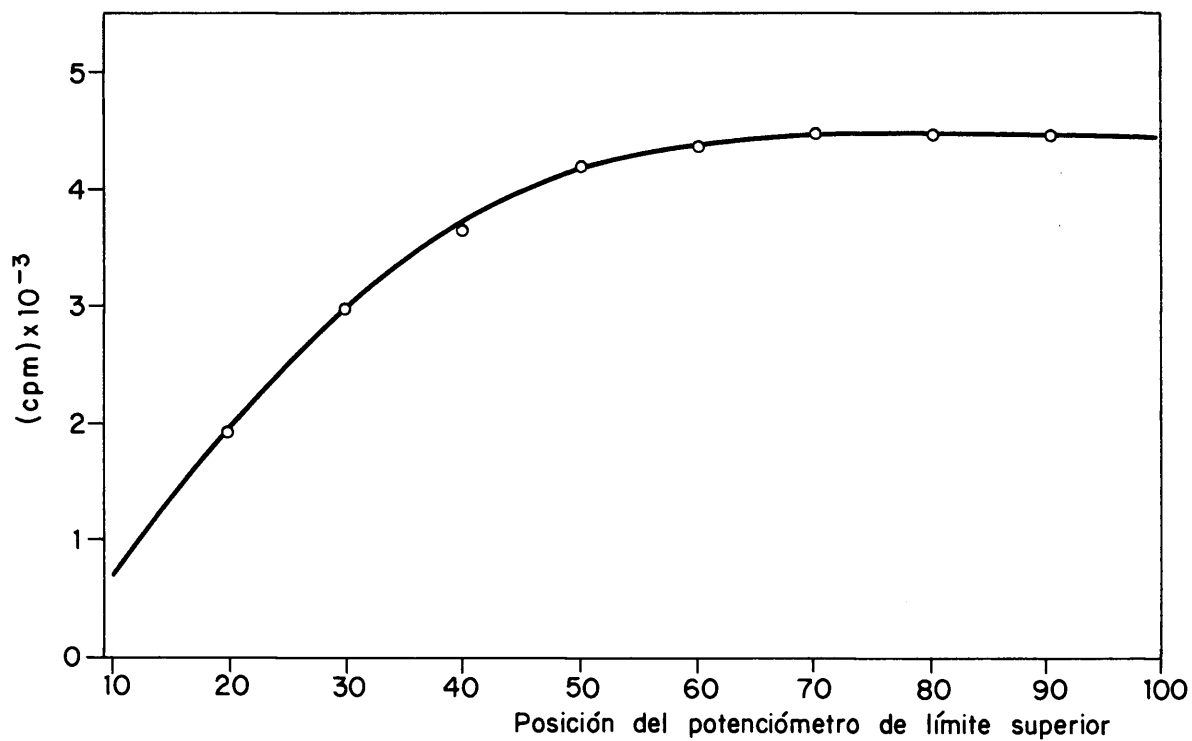


FIG.2.—DETERMINACION DEL LIMITE SUPERIOR DE ALTURA DE IMPULSO.

A su vez se han determinado los límites superior e inferior de altura de impulso, que hacen máxima la llamada cifra de mérito, que recordemos viene dada por la relación:

$$\frac{(\text{cpm corregidas por fondo})^2}{\text{fondo}}$$

En el contador Tri-Carb 314 E, estos límites están controlados, para cada uno de los canales, por sendos potenciómetros de 100 divisiones. Para la determinación del límite inferior, se miden las cpm de una muestra, en diferentes posiciones, desde 0 hasta 20, del potenciómetro correspondiente, manteniendo el de control de altura máxima de impulso en la posición 70. En la TABLA II se reflejan los valores obtenidos.

Como puede observarse, el fondo debido a ruido electrónico en los preamplificadores, se hace ya suficientemente bajo a partir de un límite inferior igual a 7. No conviene situarlo muy alto, puesto que comienza a decrecer el valor del conteo corregido por fondo, por lo que adoptamos el valor 9, siguiendo el criterio general de situar dicho límite inferior de tamaño de impulso, ligeramente por encima del valor que elimina el ruido térmico.

TABLA II. Determinación del límite inferior de  
altura de impulso.

Posición del límite infe- rior.	cpm de la muestra.	cpm de fondo.	cpm corri- das por fon- do.
0	6.405	348	6.057
1	6.140	328	5.812
2	6.050	291	5.759
3	5.722	45	5.677
4	5.525	17	5.508
5	5.094	14	5.083
6	4.840	13	4.827
7	4.608	10	4.598
8	4.412	8	4.404
9	4.182	8	4.174
10	3.915	8	3.907
20	2.088	4	2.084

Para la determinación del límite superior,  
se miden las cpm de una muestra, para diferentes po-  
siciones del potenciómetro correspondiente entre 20  
y 100, manteniendo fijo el límite inferior en la po-  
sición 9. Igualmente se determina el fondo en cada

una de estas condiciones. En la TABLA III se resumen los resultados obtenidos.

TABLA III. Determinación del límite superior de altura de impulso.

Posición del límite superior.	cpm de la muestra.	cpm de fondo.	cpm corregidas por fondo.
20	1.832	4	1.828
30	2.969	5	2.964
40	3.638	6	3.632
50	4.182	8	4.174
60	4.344	9	4.335
70	4.458	9	4.449
80	4.423	13	4.410
90	4.450	13	4.437
100	4.440	12	4.428

En la FIG. 2 se representan los valores de cpm corregidas por fondo, obtenidos con diferentes posiciones del límite superior. Puede apreciarse que a partir del límite superior de altura de impulso fijado por la posición 70, no hay incremento apreciable en el número de cuentas corregidas por fondo. Es decir, que con un límite inferior de 9 y un límite superior de 70, se detectan en la práctica todos los impulsos debidos a desintegración de  $^{35}\text{S}$  en la muestra. Igualmente, de los resultados de la TABLA II y de la TABLA III, se deduce que el valor de la cifra de mérito es máximo en estas condiciones de anchura de ventana.

En resumen, las condiciones de operación del equipo de conteo a lo largo de todas las experiencias han sido: tensión aplicada a los fotomultiplicadores, 940 V, ganancia en los amplificadores, 10 y límites de altura de impulso, 9 y 70 respectivamente.

Por último, se determina la eficiencia del conteo de  $^{35}\text{S}$  en las condiciones arriba indicadas. A partir de una solución patrón de azufre elemental- $^{35}\text{S}$  disuelto en benceno, se preparan muestras con actividades comprendidas en el intervalo de los 0'01 a 0'12  $\mu\text{Ci}$ . Se determina la velocidad de desintegración de estas muestras en el equipo de medida utilizado. En la FIG. 3 se representa gráficamente el número de cpm corregidas por fondo obtenidas, en función de la actividad de la muestra.



Puede observarse que la respuesta del equipo es lineal (índice de correlación = 0'9990) en este intervalo de actividades. A lo largo de todo el trabajo que aquí se describe, las actividades medidas han estado comprendidas en el mencionado intervalo.

La determinación de la eficiencia de conteaje en las condiciones prefijadas, es inmediata, teniendo en cuenta que:

1  $\mu\text{Ci}$ , por definición, equivale a  $3'7 \cdot 10^4$  desintegraciones por segundo, o bien,  $22'2 \cdot 10^5$  desintegraciones por minuto. De la gráfica de la FIG. 3 se deduce que a 0'1  $\mu\text{Ci}$  le corresponden 94.240 cpm.

La eficiencia vendrá dada por:

$$E = \frac{94.240}{222.000} = 0'42$$

que expresada en tanto por ciento, equivale al 42%.

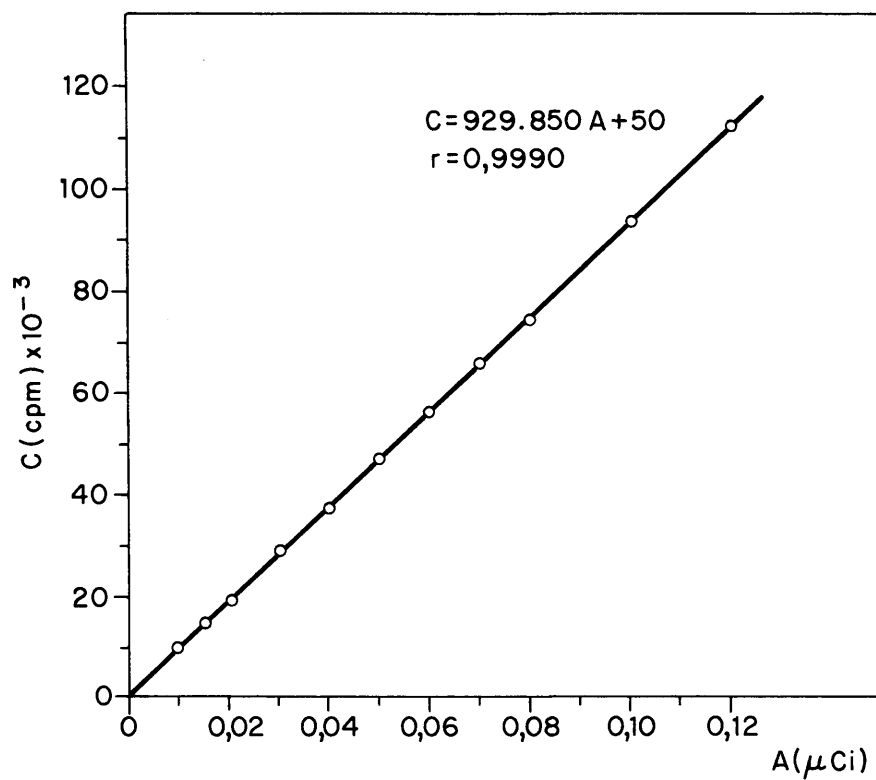


FIG.3.- EFICIENCIA EN EL CONTAJE DE  $^{35}\text{S}$ .

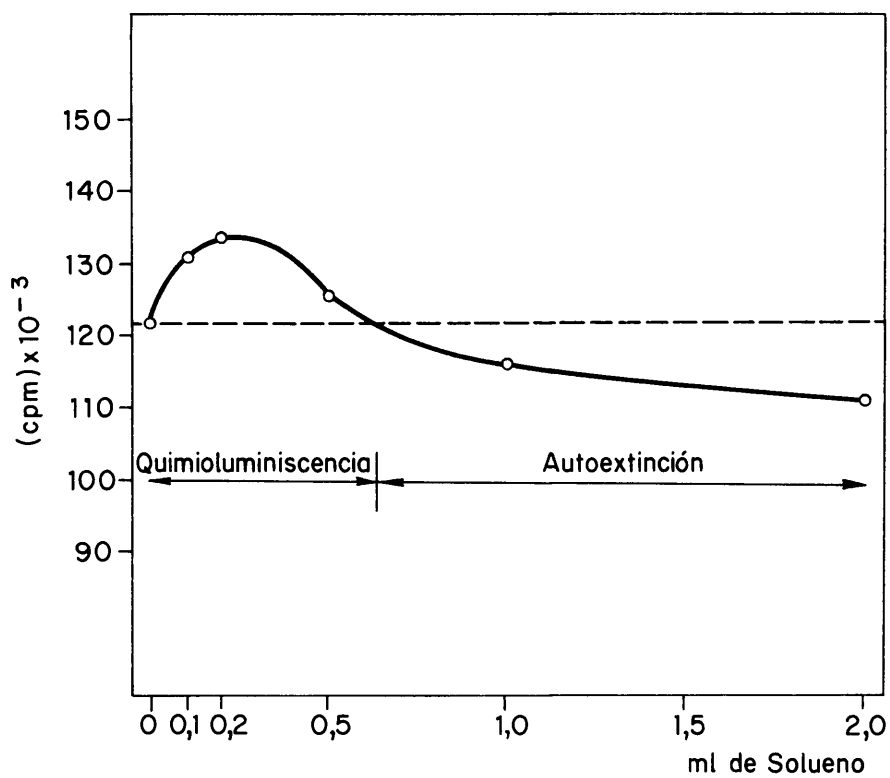


FIG.4.- INFLUENCIA DEL SOLUENO EN EL CONTAJE.

## 2.1.2. Medidas de actividad en diferentes materiales.

En el presente trabajo se ha sintetizado carbutamida marcada con  $^{35}\text{S}$ , que se ha administrado a animales de experimentación, con la finalidad de estudiar diferentes aspectos de su comportamiento fisiológico. Tanto en la fase de control de síntesis química, como en la de experimentación animal, se requiere la detección y medida de actividades en muestras de origen y forma física variable. La técnica de medida por centelleo líquido tiene grandes posibilidades en este sentido, ya que permite la medida, no sólo de soluciones radiactivas, sino también de muestras más heterogéneas del tipo de solubilizados de tejidos, fluidos o extractos biológicos, localizaciones en cromatogramas o muestras sólidas de diversa naturaleza. Con el fin de obtener datos comparativos y correlación entre los diferentes resultados, como consecuencia de la diversidad de materiales que han de ser medidos, ha sido necesario un estudio previo de las condiciones más adecuadas para la preparación de las muestras en cada caso. La medida de soluciones radiactivas solubles en el medio de conteo toluénico ya especificado, no plantea ninguna dificultad. Sin embargo, son necesarias ciertas correcciones en el caso de medidas de materiales insolubles en dicho medio, y que precisan algún tratamiento previo para su incorporación al mismo.

A este respecto exponemos a continuación los métodos utilizados y los resultados obtenidos.

## 2.1.2. Medidas de actividad en diferentes materiales.

En el presente trabajo se ha sintetizado carbutamida marcada con  $^{35}\text{S}$ , que se ha administrado a animales de experimentación, con la finalidad de estudiar diferentes aspectos de su comportamiento fisiológico. Tanto en la fase de control de síntesis química, como en la de experimentación animal, se requiere la detección y medida de actividades en muestras de origen y forma física variable. La técnica de medida por centelleo líquido tiene grandes posibilidades en este sentido, ya que permite la medida, no sólo de soluciones radiactivas, sino también de muestras más heterogéneas del tipo de solubilizados de tejidos, fluidos o extractos biológicos, localizaciones en cromatogramas o muestras sólidas de diversa naturaleza. Con el fin de obtener datos comparativos y correlación entre los diferentes resultados, como consecuencia de la diversidad de materiales que han de ser medidos, ha sido necesario un estudio previo de las condiciones más adecuadas para la preparación de las muestras en cada caso. La medida de soluciones radiactivas solubles en el medio de conteo toluénico ya especificado, no plantea ninguna dificultad. Sin embargo, son necesarias ciertas correcciones en el caso de medidas de materiales insolubles en dicho medio, y que precisan algún tratamiento previo para su incorporación al mismo.

A esto respecto exponemos a continuación los métodos utilizados y los resultados obtenidos.

#### 2.1.2.1. Medidas de actividad en tejidos animales.

La medida de niveles de actividad presentes en diferentes tejidos corporales de un animal al que se ha administrado un compuesto marcado, en este caso con  $^{35}\text{S}$ , plantea el problema de poner el material biológico extraído del animal, en las condiciones de contaje habituales en la técnica de centelleo líquido, a fin de obtener una eficiencia máxima, para lo cual es preciso incorporar el material a medir, a la solución centelleadora. Dos métodos generales se vienen utilizando: técnicas de suspensión y técnicas de solubilización. La tendencia actual está orientada hacia la solubilización siempre que sea posible. El hidróxido de Hyamina (hidróxido de p-diisobutil-cresoxietoxietil-dimetilbencilamonio) es un clásico agente solubilizante de aplicación muy extendida y utilidad muy versátil en diferentes problemas de contaje. Las firmas Packard (100) e Intertechnique (101) han publicado boletines técnicos en los que se hacen revisiones sobre las posibilidades de este producto en la medida de actividades, para diferentes materiales biológicos. Concretamente, referido a tejidos animales, el procedimiento recomendado es el siguiente: el material cuya actividad se ha de medir (aproximadamente de 5 a 20 mg) se disuelve en el propio vial de contaje, en la mínima cantidad (0'5 a 1 ml) de hidróxido de Hyamina (1 M en metanol). Una vez conseguida la solubilización, se añaden 10-15 ml de solución centelleadora de tolueno-PPO-POPOP.

Si no es posible conseguir la disolución a temperatura ambiente, puede calentarse suavemente, pero es aconsejable que la duración del calentamiento y la temperatura del mismo se mantengan en los valores mínimos posibles, ya que temperaturas superiores a 50-60° C, favorecen la formación de color, que ocasiona autoextinción adicional a la producida por el propio hidróxido de Hyamina.

Más recientemente se ha comercializado un nuevo agente solubilizante: Solueno-100 (102) (en adelante lo denominaremos simplemente Solueno), con propiedades notoriamente ventajosas sobre el hidróxido de Hyamina, sobre todo con respecto al tiempo que se necesita para solubilizar una determinada cantidad de tejido. En efecto, estos tiempos se reducen en unas 10 veces, lo cual simplifica notablemente la preparación de las muestras. En nuestras experiencias hemos observado que, en términos generales, cantidades de tejido del orden de 50 a 100 mg pueden ser solubilizadas en 1 ml de Solueno en un tiempo que oscila entre las 0'5 y las 2 horas, si se mantienen los viales en agitación en un baño termostatzado a temperatura no superior a 60° C. En estas mismas condiciones, el hidróxido de Hyamina requiere un tiempo de solubilización que oscila entre las 8 y las 20 horas. Dado que esta reducción de tiempo es realmente importante, hemos adoptado el Solueno como agente solubilizador de tejidos en todas nuestras experiencias.

#### 2.1.2.2. Medida de actividades en sangre y orina.

La medida de actividades en sangre y orina, al igual que en el caso de tejidos, plantea la necesidad de incorporar los materiales al líquido centelleador. Las publicaciones de Packard e Intertechnique antes citadas presentan igualmente revisiones bastante completas de los procedimientos seguidos para este fin, resultando ser un método suficientemente rápido y eficaz, la disolución de estos materiales en hidróxido de hidroxilamina. Las soluciones obtenidas, sobre todo las de sangre completa, tienen color más o menos pronunciado, que da lugar a autoextinción en las muestras y como consecuencia, pérdida de eficiencia en el conteo. Este inconveniente puede en parte soslayarse mediante tratamiento de la solución con peróxido de hidrógeno, destruyendo posteriormente el exceso de reactivo por acidificación, ya que éste es causa de extinción importante.

En nuestras experiencias hemos utilizado con ventaja el Soluene, en el conteo de actividades en pequeños volúmenes de sangre, plasma y orina. El procedimiento seguido en el caso de sangre ha sido el siguiente:

0.010 ml de sangre se colocan en un vial de conteo; se añade 1 ml de Soluene y se agita hasta disolución de la muestra; a continuación 0.250 ml de

peróxido de hidrógeno al 30%. Finalmente, una vez decolorada la solución, se agregan 0'100 ml de ácido clorhídrico concentrado para eliminar el exceso de peróxido. La muestra, previa adición de solución centelleadora toluénica, queda lista para la medida de actividad.

La medida en plasma se realiza de manera análoga, prescindiendo del tratamiento con peróxido de hidrógeno y la acidificación subsiguiente. Para la medida de actividad en orina, se incorporan al líquido centelleador cantidades de orina que oscilan entre 0'010 y 0'100 ml, previo tratamiento con 1 ml de Solueno.

#### 2.1.2.3. Utilización de Solueno como agente solubilizante.

En un estudio previo, se ha determinado la influencia del Solueno sobre el valor del conteo de una muestra de  $^{35}\text{S}$ , en la solución centelleadora de tolueno-PP6-POPOP utilizada en todas las experiencias. Esta influencia puede manifestarse en quimioluminiscencia del propio Solueno, que aumenta el valor del conteo, o bien en extinción ("quenching"), que disminuye dicho valor. Ambos efectos tienen lugar con el Solueno, predominando uno o el otro, según la concentración del mismo en el vial de conteo. Cuando la cantidad de Solueno añadida al vial aumenta, se intensifica el color amarillento,



lo cual justifica la extinción creciente observada. Con el fin de conocer exactamente esta influencia del Solueno en el conteo de las muestras, se llevan a cabo una serie de medidas sobre una muestra patrón de  $^{35}\text{S}$ , cuyos resultados se detallan en la TABLA IV. Puede observarse que concentraciones bajas de Solueno producen quimioluminiscencia que eleva el valor del conteo mientras que para concentraciones superiores, el efecto de extinción es más significativo, como consecuencia de la intensificación del color amarillo de las muestras, y el resultado es una disminución del valor del conteo. En la misma tabla se ha indicado el tanto por ciento que representan estas variaciones, respecto al valor real de actividad dado por la muestra nº 1, y en la FIG. 4 se representan gráficamente los valores del conteo, en función del volumen de solueno añadido a la muestra.

TABLA IV. Variación del valor del conteo de una muestra de  $^{35}\text{S}$ , con la cantidad de Solueno presente en la misma.

Nº	Muestra	Valor del conteo en cpm.	% de variación respecto a la muestra nº 1
1	0'1 ml de solución patrón de $^{35}\text{S}$ + centelleador. (A) (B)	123.170	—
2	A la muestra nº 1, se le han añadido 0'100 ml de Solueno.	131.020	+ 6'37
3	A la muestra nº 1, se le han añadido 0'200 ml de Solueno	134.170	+ 8'93
4	A la muestra nº 1, se le han añadido 0'500 ml de Solueno	125.940	+ 2'24
5	A la muestra nº 1, se le han añadido 1'000 ml de Solueno.	117.090	- 4'93
6	A la muestra nº 1, se le han añadido 2'000 ml de Solueno	102.920	- 16'43

(A) La solución patrón de  $^{35}\text{S}$  es una solución de azufre elemental- $^{35}\text{S}$  en benceno.

(B) El centelleador contiene Tolueno-PPO-POPOP en las concentraciones ya especificadas.

2.1.2.4. Corrección de las medidas por autoextinción  
debida al calor de las muestras.

Las disoluciones de tejidos animales en Solueno, presentan cierta tonalidad amarilla, de intensidad variable, de acuerdo con el tipo de tejido y la cantidad del mismo. El empleo de calor para favorecer la disolución de las muestras (principalmente, si la temperatura es superior a 60°C), ocasiona una intensificación del color, y como consecuencia, una autoextinción que disminuye el valor del contaje, que se suma a la debida al propio Solueno tal como se vió en 2.1.2.3. (5%, para 1 ml de agente solubilizante). Es importante evaluar por tanto, la magnitud de la autoextinción por color, cuando se realiza el contaje de los diferentes tejidos, si se quieren obtener datos comparativos, así como unificar la cantidad de agente solubilizante utilizada, el tiempo y la temperatura de solubilización. Con este propósito, y con el fin de <sup>U</sup>que la autoextinción debida a la presencia de Solueno, sea la misma en todas las medidas, la preparación de las muestras se ha realizado disolviendo cantidades de tejido entre 0'050 y 0'100 g en 1 ml de Solueno, manteniendo una agitación suave durante 2 horas y una temperatura de 50°C.

Por otro lado volviendo a la autoextinción ocasionada por la solubilización de la muestra de tejido, que es el efecto de mayor cuantía, la corrección

podría realizarse aplicando el método habitual del patrón interno. Sin embargo, se ha querido realizar un estudio más completo de las características del Solueno como solubilizador de tejidos y de la influencia que presenta el color de las muestras sobre la eficiencia del conteo.

En las experiencias realizadas con este fin, se toman muestras de 0'0200, 0'0400, 0'0600, 0'0800, y 0'1000 g de hígado, riñón, páncreas y corazón, de ratas intactas, recién sacrificadas. Las muestras se tratan en los mismos viales de conteo con 1'0 ml de Solueno, y se mantienen en agitación durante 2 horas a 50°C. Las soluciones obtenidas presentan diferentes tonalidades amarillas, de acuerdo con la cantidad y tipo de tejido. A cada vial se le añaden 15 ml de la solución centelleadora ya especificada y 0'100 ml de solución patrón de  $^{35}\text{S}$  de actividad conocida. De forma análoga, se tratan 0'010 ml de sangre; la solución resultante presenta una coloración intensa, que se atenúa mediante la adición de 0'250 ml de peróxido de hidrógeno al 30%, eliminando el exceso de reactivo con 0'01 ml de ácido clorhídrico concentrado. Se completa la preparación de la muestra agregando igualmente 0'100 ml de solución patrón de  $^{35}\text{S}$  y 15 ml de solución centelleadora.

Simultáneamente, se prepara un blanco que contiene 1 ml de Solueno, 0'100 ml de solución patrón de  $^{35}\text{S}$  y 15 ml de solución centelleadora.

La medida de actividades de las diferentes muestras permite, por un lado, evaluar la pérdida de eficiencia en el conteo, con relación al blanco, y por otro lado, determinar la variación de esta pérdida de eficiencia con el aumento en la cantidad de tejido presente en la muestra.

#### 2.1.2.5. Resultados.

En la TABLA V se recogen los valores obtenidos en la medida de las diferentes muestras y se detalla asimismo, en valor absoluto, y como tanto por ciento del valor del conteo obtenido para el blanco, la disminución en la eficiencia de las medidas. Este tanto por ciento de extinción, que llamamos "grado de extinción" y se representa por  $g$ , aumenta, como es de esperar, para cada tipo de tejido, con la cantidad de material solubilizado.

Estos datos son muy significativos, puesto que demuestran que para cantidades de 0'100 g de tejido, el grado de extinción alcanza valores de 43'25% para hígado y 45'10% para riñón. A su vez,

los valores de  $\underline{g}$  encontrados para las muestras de 0'010 ml de sangre, son del orden del 27%. De todo ello se deduce que, para obtener resultados comparativos es importante introducir las correcciones adecuadas en los valores de contaje obtenidos, toda vez que, diferentes clases de tejidos y cantidades de los mismos, dan lugar a grados de extinción que varían dentro de un amplio margen.

La relación encontrada entre la cantidad de tejido digerido y el grado de extinción observado, es prácticamente lineal en el intervalo estudiado. En la FIG. 5 se representan los diferentes valores de  $\underline{g}$ , frente a la cantidad de material solubilizado  $\underline{m}$ , expresada en gramos. Los puntos experimentales se ajustan a una recta de ecuación  $\underline{g} = K\underline{m}$ , para cada tipo de tejido. Los diferentes valores de  $K$  y los índices de correlación lineal  $\underline{r}$ , se detallan en la TABLA VI.

Mediante las gráficas de la FIG. 5, es posible determinar el grado de extinción, para diferentes cantidades de tejido solubilizado. Ahora bien, como muestras de peso idéntico, del mismo tejido, pueden dar lugar a diferente coloración, estas gráficas no dan una solución definitiva al problema y por ello debe buscarse un procedimiento de corrección

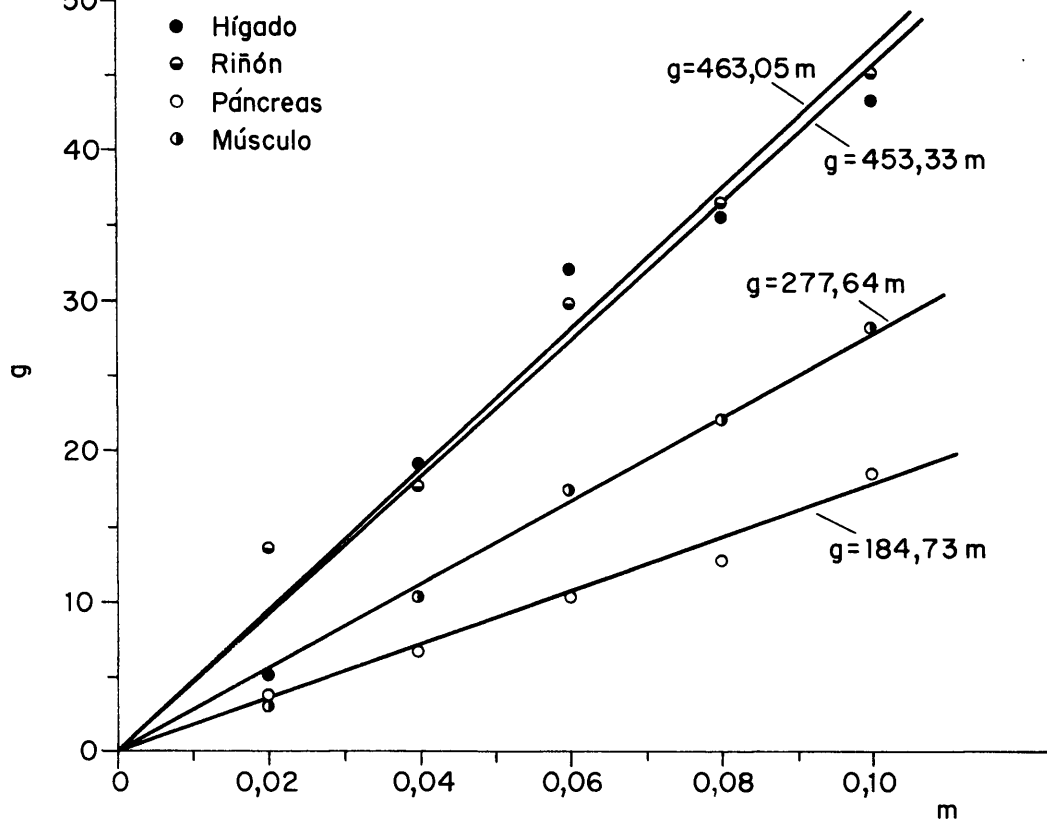


FIG.5.—EXTINCION EN EL CONTAJE DE DIFERENTES TEJIDOS, EN FUNCION DE LA CANTIDAD DE TEJIDO SOLUBILIZADO.

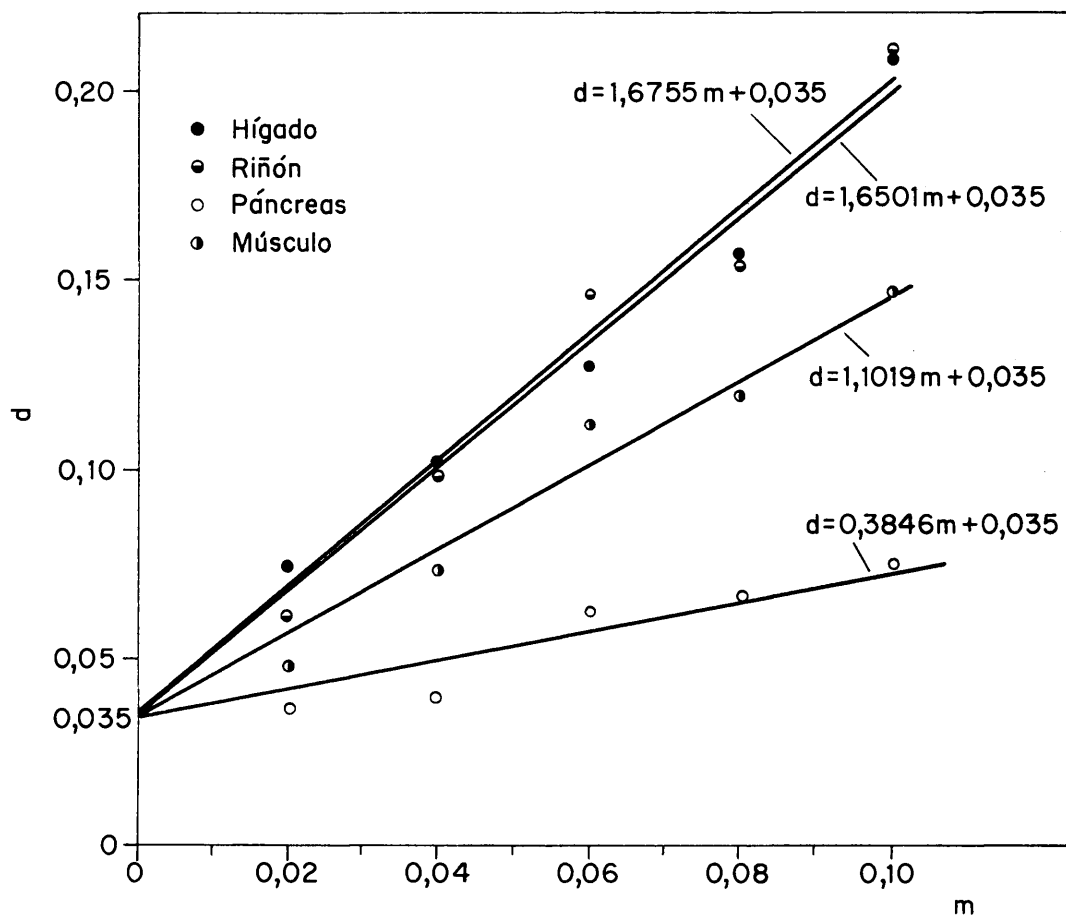


FIG.6.—DENSIDAD OPTICA DE LAS MUESTRAS, EN FUNCION DE LA CANTIDAD DE TEJIDO SOLUBILIZADO.

TABLA V. Eficiencia en el conteaje de muestras de diferentes tejidos.

Tejido	m, cantidad de tejido solubilizado (gramos)	Actividad (cpm)	Disminución respecto al blanco (A).	g, grado de extinción.
HIGADO	0'0200	35.390	1.980	5'298
	0'0400	30.120	7.250	19'400
	0'0600	25.330	12.040	32'218
	0'0800	24.100	13.270	35'510
	0'1000	21.170	16.200	43'350
RIÑON	0'0200	32.360	5.010	13'406
	0'0400	30.710	6.660	17'822
	0'0600	26.200	11.170	29'890
	0'0800	23.680	13.690	36'634
	0'1000	20.510	16.860	45'116
PANCREAS	0'0200	35.980	1.390	3'719
	0'0400	35.050	2.320	6'208
	0'0600	33.860	3.510	9'392
	0'0800	32.610	4.760	12'737
	0'1000	30.970	6.400	17'126
MUSCULO CARDIACO	0'0200	36.210	1.160	3'104
	0'0400	33.560	3.810	10'195
	0'0600	30.833	6.537	17.493
	0'0800	29.119	8.251	22'079
	0'1000	26.810	10.560	28'258

(A) Actividad del blanco: 37.370 cpm.



que valore directamente la relación entre el color de las muestras y el grado de extinción.

TABLA VI. Valores de K y  $\underline{r}$  de las funciones que relacionan el grado de extinción con la cantidad de tejido solubilizado.

Tejido	K	$\underline{r}$
Hígado	453'33	0'974
Riñón	463'05	0'993
Páncreas	184'73	0'996
Corazón	277'64	0'997

Con esta finalidad se determina la densidad óptica a 425 nm, de las muestras recogidas en la TABLA V. Para cada tipo de tejido, se encuentra una relación lineal entre la cantidad  $\underline{m}$  de material solubilizado y la densidad óptica  $\underline{d}$  de las muestras. En la FIG. 6 se representan los diferentes valores, que se ajustan a cuatro líneas rectas de la forma  $d = Am + B$ , una para cada tipo de tejido. En la TABLA VII se especifican los valores de los parámetros correspondientes a estas ecuaciones y sus índices de correlación lineal.

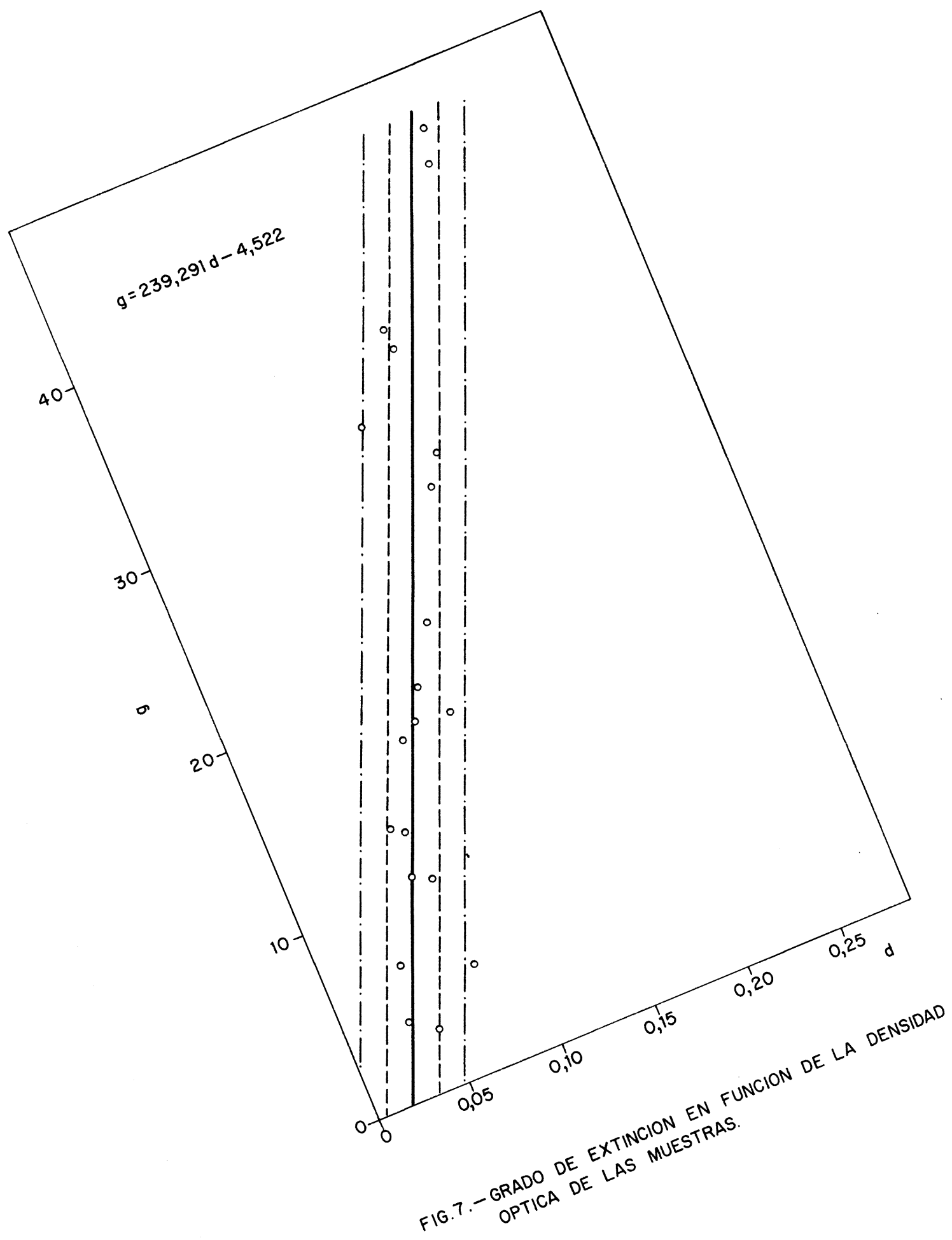
TABLA VII. Valores de los parámetros A y B y del índice de correlación  $r$  de las funciones que relacionan la densidad óptica y la cantidad de tejido solubilizado.

Tejido	A	B	r
Hígado	1'650	0'035	0'9841
Riñón	1'675	0'035	0'9805
Páncreas	0'384	0'035	0'9638
Corazón	0'102	0'035	0'9918

Como consecuencia de las relaciones lineales encontradas entre  $g$  y  $m$  por una parte y entre  $d$  y  $m$  por otra, es perfectamente lógico que exista una relación también lineal entre el grado de extinción  $g$  observado en la muestra y la densidad óptica  $d$  de la misma, puesto que la extinción es una consecuencia del color. En efecto, cuando se representan los pares de valores de  $g$  y  $d$  correspondientes a la totalidad de las muestras, se obtiene la serie de puntos representados en la FIG. 7, que pueden ajustarse a una recta de ecuación:

$$g = 239'291d - 4'522$$

cuyo coeficiente de correlación lineal es  $r = 0'9714$ .



Para esta recta de regresión de los valores de  $\underline{g}$  sobre los de  $\underline{d}$  se ha determinado el error standard  $s_{g.d}$  dado en este caso por

$$s_{g.d} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (g_o - g_t)^2}{n-2}}$$

de acuerdo con la definición dada en (2,2) y donde

$g_o$ , son valores experimentales para los distintos valores de  $\underline{d}$ .

$g_t$ , son valores obtenidos según la recta de regresión ajustada, para los distintos valores de  $\underline{d}$ .

$n$ , es el número de pares de valores muestrales, en este caso igual a 20.

El valor obtenido es  $s_{g.d} = 3.40$

En la FIG. 7, se han representado, junto a los puntos experimentales, la recta ajustada y las bandas correspondientes a  $\pm 1 s_{g.d}$  y  $\pm 2 s_{g.d}$ . Finalmente se han determinado los límites de confianza de la recta de regresión  $g = f(d)$ , definidos por

$$\pm t_{p\%} \cdot \frac{s_{g.d}}{\sqrt{n-1}}$$

Para un nivel de significación del 95%,  
siendo  $n=20$  y el número de parámetros ajustados  
 $v = 2$ , por lo que el número de grados de libertad  
es  $G = (n - v) - 1 = 17$ , el valor de  $t$  resulta ser  
 $t_{95\%} = 2'110$ .

Sustituyendo todos los valores, los límites de confianza resultan:

$$\pm 2'110 \cdot \frac{3'40}{\sqrt{19}} = 1'649$$

En consecuencia, la recta ajustada puede escribirse:

$$g = 239'291d - 4'522 \pm 1'649$$

Esta relación es totalmente general y aplicable a la corrección del conteo de cualquier muestra preparada en las condiciones descritas. Puede utilizarse por lo tanto para corregir el conteo de muestras de cualquier tipo de tejido o fluido biológico, siempre que la cantidad de material medido sea tal que la densidad óptica de la muestra que se obtiene esté dentro de los límites en los que se ha realizado esta experiencia con material en blanco.

Todavía puede hacerse con más comodidad la corrección, si en lugar de la función  $g = f(d)$ , en la que  $g$  representa el tanto por ciento de extinción en el conteo, se utiliza otra, deducida de ésta, que da directamente el factor de corrección por el que se ha de multiplicar el valor obtenido en el contador de centelleo. Llamando  $f$  a este factor de corrección, su relación con  $g$  será:

$$f = \frac{100}{100-g} \quad \text{y eliminando } g \text{ entre esta expresión}$$

y la  $g = 239'291 d - 4'522$ , se obtiene para  $f$  el valor:

$$f = \frac{1}{1'0452 - 2'3929 d},$$

ecuación que, al igual que la recta  $g = 239'291 d - 4'522$ , es válida para la corrección del conteo de cualquier muestra preparada en las condiciones descritas. Tanto la función  $f = F(d)$  deducida como los valores experimentales de  $f$ , se representan en la FIG. 8.

En la TABLA VIII se han sumariado todos los datos referentes a las gráficas de la FIG. 7 y la FIG. 8. Las dos primeras columnas son valores experimentales de  $d$  y  $g$ , los cuales se han ajustado a la función  $g = f(d)$ . En la tercera columna se dan los valores de  $g$  teóricos, deducidos según esta función ajustada. Las columnas cuarta y quinta

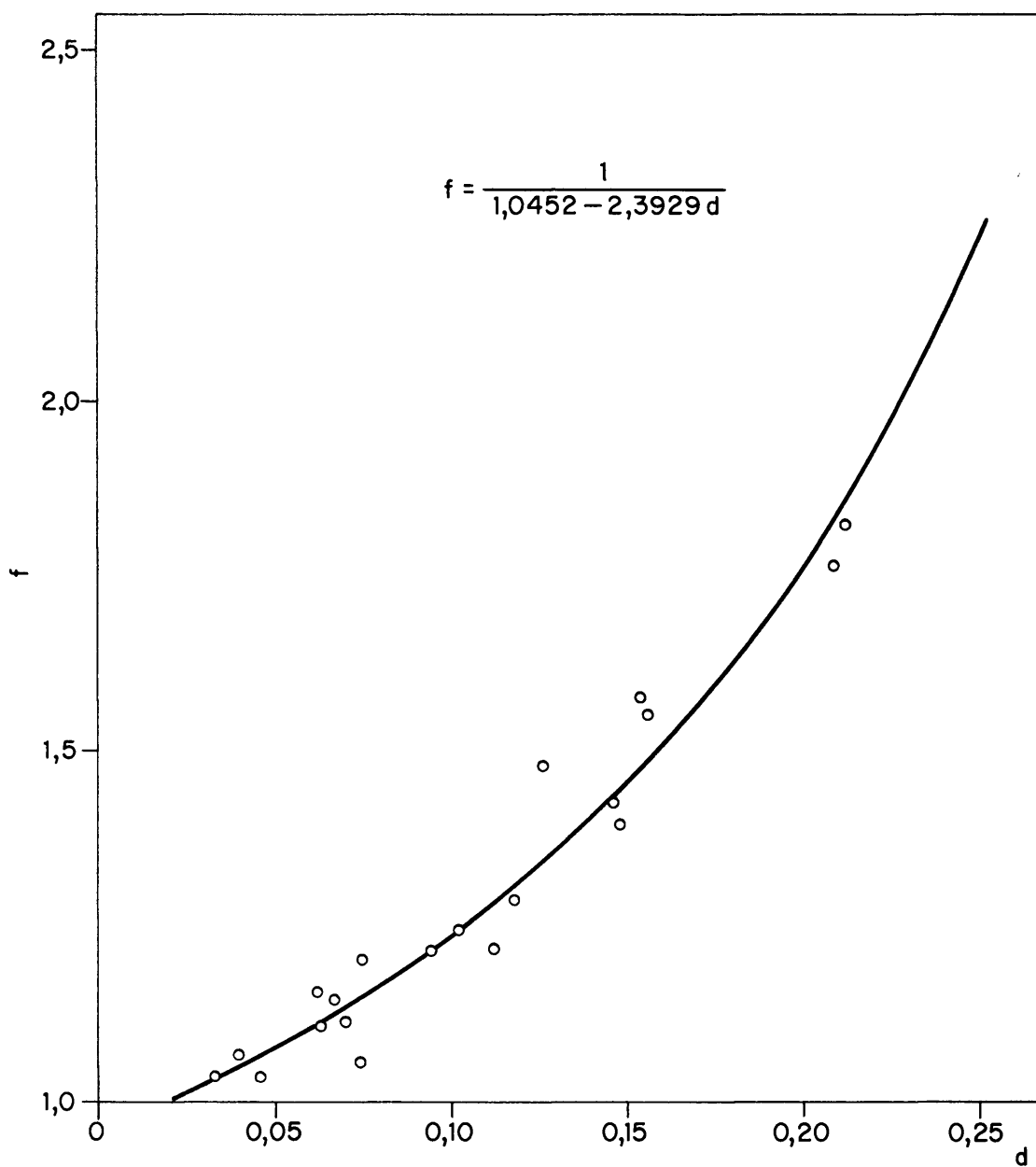


FIG.8. — FACTOR DE CORRECCION POR EXTINCION DEBIDA A COLOR, EN FUNCION DE LA DENSIDAD OPTICA DE LAS MUESTRAS.

contienen los valores del factor de corrección  $\underline{f}$ , obtenidos a partir de los valores de  $\underline{g}$  experimentales y teóricos, respectivamente.

Con objeto de conocer en qué grado la función que nos da el valor de  $\underline{f}$  es representativa del fenómeno estudiado, se ha determinado el valor que toma el estadístico  $\chi^2$  de Pearson, que viene dado en este caso por:

$$\chi^2 = \sum_{t=1}^n \frac{(f_t - f_e)^2}{f_t}$$

donde  $f_t$  son valores teóricos (columna quinta de la tabla) y  $f_e$  valores experimentales (columna cuarta de la misma tabla). Se obtiene el valor

$$\chi^2 = 0.045$$

Para un nivel de significación del 99% y 17 grados de libertad, el valor de  $\chi^2_{99\%}$  tabulado es 6.408. Puesto que se cumple que  $\chi^2 < \chi^2_{99\%}$ , la hipótesis puede aceptarse con el nivel de significación establecido. Dicho en otros términos, el factor de corrección por extinción debida a color, deducido según la ecuación

$$f = \frac{1}{1.0452 - 2.3929 d}$$

puede aceptarse con una probabilidad de ser cierto del 99%.



TABLA VIII. Densidad óptica de las muestras a 425 nm, grado de extinción y factor de corrección.

$d_e$	$g_e$	$g_t$	$f_e$	$f_t$
0'074	5'298	13'185	1'056	1'152
0'102	19'400	19'886	1'241	1'248
0'127	32'218	25'868	1'475	1'394
0'156	35'510	32'807	1'551	1'488
0'209	43'350	45'490	1'765	1'834
0'062	13'406	10'314	1'155	1'115
0'094	17'822	17'971	1'217	1'219
0'146	29'890	30'414	1'426	1'143
0'155	36'634	32'568	1'578	1'483
0'212	45'116	46'208	1'822	1'859
0'033	3'719	4'092	1'039	1'043
0'040	6'208	5'050	1'066	1'053
0'063	9'392	10'553	1'104	1'118
0'067	12'737	11'510	1'146	1'130
0'075	17'126	13'425	1'207	1'155
0'046	3'104	6'485	1'032	1'069
0'072	10'195	12'707	1'113	1'145
0'112	17'493	22'278	1'212	1'287
0'119	22'079	23'954	1'283	1'318
0'147	28'258	30'654	1'394	1'442

El método de corrección propuesto se resume así:

Tejidos: Una vez preparada la muestra y determinada su actividad por contaje, 5 ml de solución se vierten en un tubo de colorimetría y se mide su densidad óptica a 425 nm (se utiliza un colorímetro Spectronic 340 de Bausch Lomb). El valor de  $d$  obtenido, se lleva sobre abscisas en la gráfica de la FIG. 8 y se obtiene directamente en ordenadas el factor de corrección que se ha de introducir al valor de cpm obtenido en el contaje por centelleo, para determinar el valor corregido de la actividad en la muestra medida.

Sangre: El procedimiento es el mismo descrito para tejidos, siempre que se tome como muestra una cantidad de sangre inferior a 0'030 ml. Cantidades mayores dan una  $d$  excesiva, que sale del intervalo en el que se han correlacionado densidad óptica y extinción.

Plasma y orina: El procedimiento es el mismo que para tejidos. Teniendo en cuenta que estos materiales dan un color muy poco pronunciado al incorporarlos al Solueno, cuando los volúmenes medidos son del orden de 0'01 ml, puede prescindirse de la

corrección por extinción debida al color, sin que el error cometido sea superior al 4%, que por otra parte, queda eliminado cuando se realizan medidas comparativas en las mismas condiciones. La única limitación al volumen de las muestras es la escasa capacidad del Solueno para incorporar muestras acuosas a una solución centelleadora toluénica. Para la medida de estas muestras puede utilizarse hidróxido de Hyamina como solubilizador o bien una solución centelleadora a base de tolueno-etanol (6:4).

#### 2.1.2.6. Medidas en suspensión.

La medida de materiales que no pueden incorporarse a la solución centelleadora por solubilización, se ha realizado mediante la técnica de suspensión. Este es el caso de la medida cuantitativa de cromatogramas, sobre gel de sílice, de plasma, orina, extractos de órganos, o las mismas soluciones de Carbutamida marcada. El material utilizado para formar la suspensión homogénea de la muestra en el seno de la solución centelleadora ha sido CAB-O-SIL, gel de sílice tixotrópica, (Packard). La pérdida de eficiencia en las medidas en suspensión en estas condiciones se ha calculado en un 10'3%.

Igualmente se han medido por esta técnica de suspensión las muestras de heces en las experiencias con animales, previa desecación de las mismas a 125°C durante 4 horas y trituración al máximo. La pérdida de eficiencia en estas medidas se ha calculado en un 21%, aplicando el método del patrón interno.

## 2.2 CONCEPTOS ESTADISTICOS. (103, 104)

A lo largo del trabajo se ha pretendido en determinados casos, relacionar los resultados experimentales a través de expresiones matemáticas adecuadas. En general, la relación entre dos variables cualesquiera  $\underline{x}$  é  $\underline{y}$  se ha ajustado a una función hipotética convencional  $y = f(x)$  mediante el método de los mínimos cuadrados. En el caso de funciones lineales se ha determinado el índice de correlación lineal  $\underline{r}$ , que recordemos viene dado por:

$$r = \frac{\sum_1^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_1^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot (y_i - \bar{y})^2}}$$

donde,  $x_i$  é  $y_i$  son pares de valores muestrales.

$\bar{x}$  é  $\bar{y}$  son valores medios de los  $\underline{x}$  é  $\underline{y}$  muestrales, respectivamente.

Si  $r = +1$ , hay correlación perfecta positiva entre

los pares de valores  $x_i$  é  $y_i$ .

Si  $0 < r < 1$ , hay correlación positiva.

Si  $r = -1$ , hay correlación perfecta negativa.

Si  $-1 < r < 0$ , hay correlación negativa.

Si  $r = 0$ , no hay correlación.

La bondad de los ajustes efectuados, de pares de valores muestrales a una función hipotética  $y = f(x)$ , se verifica mediante determinación del valor que toma el estadístico  $\chi^2$  de Pearson. Si  $n$  es el número de pares de valores muestrales (número de observaciones independientes en la muestra) y  $\nu$  el número de parámetros de la función ajustada, la distribución límite de  $\chi^2$  es válida con tal de que el número de grados de libertad en la distribución límite sea

$$G = (n - \nu - 1)$$

Esta condición se cumple en todos los casos en que se ha determinado  $\chi^2$ . Recordemos asimismo que  $\chi^2$  viene dado por:

$$\chi^2 = \sum_{t=1}^n \frac{(y_t - y_e)^2}{y_t}$$

donde,  $y_t$  son valores teóricos de  $y$  deducidos de la función ajustada, para los diferentes valores de  $x$ .

$y_e$  son valores experimentales de  $y$ .

Si se establece como nivel de significación el  $p\%$ , para  $(n - 1)$  grados de libertad,  $\chi^2$  tendrá un valor tabulado que llamaremos  $\chi^2_{p\%}$ . Cuando se cumple que  $\chi^2 > \chi^2_{p\%}$ , la muestra tiene una desviación significativa respecto de la función de distribución hipotética y ésta debe rechazarse. Por el contrario, si  $\chi^2 \leq \chi^2_{p\%}$ , la hipótesis puede aceptarse con el nivel de significación establecido, lo cual viene a decir en otros términos, que con un  $p\%$  de probabilidad, los valores de  $y$  experimentales son representables por la función  $y = f(x)$  a la que se han ajustado.

Finalmente, cuando una determinada muestra de valores experimentales  $x_i$  ó  $y_i$  se han ajustado a una función lineal (recta de regresión)  $y = Ax + B$ , puede determinarse el error standard  $s_{y.x}$  que corresponde a dicha recta de regresión. Este estadístico viene definido por

$$s_{y.x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_e - y_t)^2}{n}}$$

donde  $y_o$  son los valores experimentales de  $y$  para los diferentes valores de  $x$ .

$y_t$  son los valores teóricos de  $y$  deducidos de la recta de regresión ajustada, para los diferentes valores de  $x$ .

De manera análoga se define el error standard  $s_{xy}$  correspondiente a la recta de regresión  $x = A'y + B'$ .

El estadístico  $s_{y.x}$  tiene propiedades análogas a las del estadístico desviación standard de una media y por lo tanto, si se construyen líneas paralelas a la de regresión  $y = Ax + B$  a distancias  $\pm 1 s_{y.x}$ ,  $\pm 2 s_{y.x}$ ,  $\pm 3 s_{y.x}$  de la misma, y  $n$  se supone suficientemente grande, quedan incluidos entre las bandas limitadas por estos pares de líneas, respectivamente el 68'27, 95'45 y 99'73% de los puntos de la muestra. Efectivamente, puesto que para muestra infinita, el número de grados de libertad se hace infinito, cabe esperar que para cada valor de  $x$ , se obtenga una distribución normal de  $y$ .

En particular, si la recta de regresión se construye a partir de un tamaño de muestra pequeño (menos de 30 pares de valores), es conveniente utilizar la siguiente expresión de  $s_{y.x}$ :



$$s_{y.x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_x)^2}{n-2}}$$

y la distribución de valores experimentales de  $y$  para cada valor de  $x$  será lógicamente una distribución de Student. Recordemos que la distribución de Student viene definida por  $t$ , cuyo valor en este caso es

$$t = \frac{\bar{y} - u}{s_{y.x}} \sqrt{n-1}$$

donde  $u$ , es el valor medio que tendría  $y$  para un determinado valor de  $x$  en la muestra infinita;

$\bar{y}$ , es el valor que toma  $y$ , para el mismo valor de  $x$ , en la recta de regresión  $y = Ax + B$  obtenida a partir de una muestra de tamaño  $n$ .

En consecuencia, los límites de confianza de los valores de  $y$  obtenidos según la recta de regresión son:

$$\pm t_{p\%} \cdot \frac{s_{y.x}}{\sqrt{n-1}}$$

donde  $t_{p\%}$  está tabulado y depende de  $n$  y del nivel de confianza deseado. Para un determinado nivel de confianza, estos límites nos indican en qué magnitud los valores de  $y$  deducidos de la recta de regresión  $y = Ax + B$ , se apartan del valor que se obtendría si la muestra  $n$  fuera infinita.

## 2.3. AUTORRADIOGRAFIA.

### 2.3.1. Autorradiografía de cromatogramas.

Se ha hecho uso de la cromatografía sobre capa fina de gel de sílico, tanto para la determinación de pureza de productos marcados sintetizados, como para la identificación y separación del radiofármaco estudiado y sus metabolitos, en muestras biológicas de origen variado. Se utilizan placas de gel de sílice comerciales Camag DF-B con indicador fluorescente a 254 nm, previamente activadas a 110° C durante 10 minutos. El desarrollo de los cromatogramas se examina bajo luz ultravioleta, y la determinación cuantitativa de los posibles compuestos marcados separados, se realiza mediante contaje en suspensión por centelleo líquido, tal como se ha descrito. Como complemento de este análisis cualitativo y cuantitativo, se someten los cromatogramas a autorradiografía frente a películas tipo "Medical X-Ray RB-54" (Kodak), durante los tiempos de exposición que se indican posteriormente en cada caso. El revelado de las autorradiografías se realiza según las técnicas usuales.

### 2.3.2. Microautorradiografía histológica.

En el estudio de la distribución y acumulación

selectiva de un fármaco en diferentes órganos o sistemas, no basta con una determinación de niveles o concentraciones del fármaco en los mismos, sino que debe llegarse a una localización a nivel histológico, celular o intracelular, si se quiere conocer con cierta profundidad el curso y destino del fármaco administrado. La utilización de compuestos marcados, permite hacer uso de la técnica de autorradiografía de secciones histológicas y localizar la distribución de actividad a nivel celular. No entramos en la descripción y discusión de estas técnicas que han sido tratadas ampliamente en varias monografías, de entre las que destacamos las de Boyd (105) y más recientemente la de Rogers (106). Digamos simplemente que su fundamento está en la aplicación de una película de emulsión fotográfica sobre las secciones histológicas en las que se quiere conocer la distribución de radiactividad, de forma que se obtenga el máximo contacto entre ambos materiales. La exposición de la película fotográfica a las partículas ionizantes procedentes del material radiactivo presente en el tejido, da lugar a la formación de una imagen sobre los puntos en los cuales el compuesto marcado está localizado. El revelado de esta imagen y la tinción histológica, previa o posterior, permiten la observación directa y simultánea, al microscopio, de la

estructura tisular y, superpuesta a ella, la imagen fotográfica producida en la película sensible, que en la práctica se manifiesta en una densidad de granos de plata reducida mayor o menor sobre las diferentes estructuras observadas, según la localización del radiofármaco en las mismas.

Es fácil deducir la gran cantidad de variables que entran en juego en la aplicación de este método, unas, referentes a las características de las secciones histológicas preparadas, y otras, que dependen de la forma de aplicación de la película fotográfica y las propiedades de ésta. Se hacen a continuación algunas consideraciones sobre estas variables y, con relación a nuestro caso en concreto, se describen los métodos utilizados.

#### 2.3.2.1. Preparaciones histológicas.

Para la confección de cortes histológicos se ha seguido la técnica de inclusión en parafina (107) de las piezas de tejido. Sabido es que la fijación de tejidos y deshidratación previa a la inclusión en parafina, supone el paso de las piezas por una serie de líquidos que pueden arrastrar el compuesto marcado que se investiga en mayor o menor medida.

Este inconveniente lo soslayan en gran parte las técnicas de preparación de cortes por congelación o liofilización e inclusión posterior en parafina. A este respecto las máximas garantías están por supuesto de parte de las técnicas de congelación y así lo justifican en una reciente publicación Roth y Stumpf (108). Sin embargo, en la discusión de este mismo trabajo, Paweletz sugiere que este procedimiento puede ser también criticable en cuanto a la validez de la interpretación de resultados y su punto de vista es que "al administrar el compuesto marcado, hay un exceso de esta sustancia que no es aceptado por las células" y que por lo tanto, "este exceso debe ser eliminado". En efecto, la distribución encontrada por este procedimiento puede no corresponder exactamente a la distribución de fármaco realmente ligado a las estructuras tisulares estudiadas. Un criterio aceptable podría ser la determinación cuantitativa de la pérdida de actividad en las piezas de tejidos sometidas a un proceso de fijación y deshidratación por líquidos, lo cual da una idea de la medida en que el fármaco está unido a las estructuras celulares. En un trabajo relativamente reciente (109), Smith evalúa las pérdidas de actividad en tejidos de animales a los que se han administra-

do varios fármacos marcados, tejidos que se someten a los tratamientos rutinarios de preparación para autorradiografía y observación en microscopía óptica y electrónica. En nuestro caso se ha realizado asimismo una evaluación cuantitativa de la pérdida de actividad global en los procesos de fijación y deshidratación previos a la inclusión en parafina, cuyo resultado ofrece suficientes garantías en cuanto a la interpretación de las autorradiografías obtenidas, sin que por ello dejemos de reconocer la conveniencia de contrastar los resultados obtenidos mediante las dos técnicas de preparación de cortes para poder tener una visión completa del problema.

Para la fijación de las piezas de tejidos estudiados se ha utilizado solución de Carnoy (etanol absoluto-cloroformo-ácido acético glacial, 6:3:1:). El tiempo de fijación, para piezas de menos de 5 mm de lado, ha sido de 3 horas. A continuación se deshidratan de la manera usual, en las siguientes soluciones y tiempos:

Etanol-agua (7:1) .....	2 h.
Etanol-agua (8:1) .....	1 h.
Etanol-agua (9:1) .....	1 h.
Etanol absoluto .....	5 h.

Etanol absoluto .....	1 h.
Etanol-benceno (1:1) .....	1 h.
Benceno puro .....	2 h.
Benceno puro .....	2 h.
Benceno-parafina (2:1) a 40°C ...	4 h.
Parafina p.f. 56-58°C .....	1 h.
Parafina p.f. 56-58°C .....	1 h.

Finalmente se incluyen en parafina del mismo punto de fusión, y se preparan cortes en el microtomo de 5 micras de espesor.

Mediante una experiencia previa, se ha calculado la pérdida de peso y de actividad que tiene lugar en las piezas, a lo largo de los procesos que van desde la fijación hasta la impregnación en bencono.

A las dos horas de la administración de 50  $\mu\text{Ci}$  de Carbutamida- $^{35}\text{S}$  (actividad específica 2'34  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ) a una rata de 160 g de peso, se le extraen hígado, riñón, páncreas y corazón. Piezas de cada uno de estos órganos, de peso conocido, se someten al proceso de fijación y deshidratación. En los mismos materiales se determina la actividad por unidad de peso, mediante contaje por centelleo líquido.

En la TABLA IX se recogen los datos relativos a este ensayo. Los porcentajes de actividad remanente en las piezas de tejido, se han calculado segun la expresión:

$$\frac{\text{cpm/g de tejido fijado y deshidratado}}{\text{cpm/g de tejido fresco}} \times$$

$$\times \frac{\text{peso del tejido fijado y deshidratado}}{\text{peso del tejido fresco}} \times$$

$$\times 100 = A_r\%.$$

Los valores correspondientes a tanto por ciento de actividad remanente especificados en la TABLA IX indican que, si bien hay una apreciable pérdida de actividad en el tratamiento, hay una cantidad realmente importante de la misma que permanece unida a las estructuras tisulares, lo cual permite atribuir una suficiente fiabilidad a los resultados obtenidos según este método de confección de cortes, aun con las reservas ya apuntadas.



TABLA IX. Pérdida de peso y actividad en el proceso de fijación y deshidratación de tejidos.

	Hígado	Riñón	Páncreas	Músculo cardíaco
Peso inicial de la pieza (gramos)	0'1963	0'2006	0'0578	0'1561
Peso de la pieza fijada y deshidratada (gramos)	0'0509	0'0432	0'0172	0'0361
Pérdida de peso (%)	74'1	78'5	70'2	76'9
Actividad inicial de la pieza (cpm)	58.500	102.600	15.200	58.400
Actividad de la pieza fijada y deshidratada (cpm)	36.300	77.000	12.200	45.500
Actividad remanente (%)	62	75	80	78

#### 2.3.2.2. Procedimiento autorradiográfico.

Para la aposición de la película sensible sobre las preparaciones histológicas se ha preferido el procedimiento de emulsión líquida frente al de "stripping-film". Se recuerda que la técnica de emulsión líquida, introducida por Belenger y Leblond (110) y mejorada por Joftes y Warren (11), tiene como principio la aplicación directa de una emulsión fotográfica líquida o licuada, sobre las preparaciones histológicas, aplicación que se logra mediante un pincel, en el método inicial de Belenger y Leblond y mediante inmersión ("dipping") de la preparación completa en la emulsión, en el método introducido por Joftes y Warren, y que ha sido el que ha alcanzado mayor difusión.

En cuanto al clásico método de "stripping-film", desarrollado con anterioridad por Barriman, Herz y Stevens (112) e independientemente por Pelc (113), la capa de emulsión sensible está previamente soportada en una lámina de gelatina, montado a su vez el conjunto sobre un soporte de vidrio. Para su utilización, la lámina de gelatina, con su capa de emulsión sensible, se separa del soporte y se aplica sobre la preparación. La técnica está descrita con detalle por sus autores. En las obras de Boyd

y Rogers ya citadas anteriormente, se hacen acertados análisis comparativos de las posibilidades de aplicación de esta técnica, frente a la de emulsión líquida. Cabe señalar aquí en este sentido, que los métodos de emulsión líquida tienen a su favor sustanciales ventajas en cuanto a la sencillez y versatilidad. Desde el punto de vista técnico, es evidente que la inmersión de las preparaciones en la emulsión fotográfica y secado posterior de la película obtenida sobre ellas, proporciona un contacto máximo entre ambos materiales. Por otra parte, por dilución de la emulsión líquida comercial, puede conseguirse una película sensible de espesor mucho menor que el de las suministradas por el "stripping-film", lo cual beneficia la resolución de las autorradiografías. Además, la ausencia del soporte de gelatina, simplifica la tinción de las preparaciones posterior al proceso fotográfico, así como la observación de las mismas al microscopio. El método de emulsión líquida tiene, como inconveniente fundamental, la dificultad de obtener una capa sensible de espesor homogéneo, ya que ésta se adapta a la superficie más o menos irregular de la preparación histológica. El tratamiento de la capa de emulsión, después de la inmersión de las preparaciones, es crítico; el fondo puede aumentar considerablemente y aparecer

anormalidades de impresión, como consecuencia de un secado demasiado rápido de la película, efectos de presión, secado insuficiente o exposición en condiciones inadecuadas. Rogers hace en su obra un interesante análisis crítico de todos estos factores.

En el procedimiento seguido en el presente trabajo se ha utilizado emulsión líquida Kodak NTB-2 diluida (1:1) con solución acuosa de glicerina al 2%, que se coloca en una cubeta termostatzada a 43-45°C. Las preparaciones se impregnan por inmersión en la emulsión y se secan al aire, en posición vertical, durante 4 horas. El espesor de la película sensible obtenida en estas condiciones se estima en 3 - 4 micras. Por último, las preparaciones se almacenan durante la exposición a temperatura de 0-5°C en cajas protegidas de luz y humedad. Los tiempos de exposición se determinan empíricamente, para diferentes dosis de Carbutamida-<sup>35</sup>S, revolando las autorradiografías después de diferentes períodos. Como dato indicativo en este sentido diremos que administrando 50 µCi de Carbutamida-<sup>35</sup>S a una rata de 160 g de peso, se puede detectar su distribución a las 3 horas si, una vez obtenidos los cortes histológicos, éstos se someten a autorradiografía

durante 10-15 días de exposición fotográfica en las condiciones descritas.

De la importancia del tiempo de exposición dan idea las microfotografías de las FIGS. 9, 10, y 11. La primera de ellas corresponde a una preparación de hígado expuesta durante 5 días, en la que se aprecian pocos puntos correspondientes a localizaciones de radiactividad, en los espacios sinusoides y en los bordes libres de los cordones celulares que limitan dichos espacios. Sin embargo debe tenerse en cuenta que la observación directa al microscopio no ofrece dificultad en cuanto a la apreciación de la impresión autorradiográfica, toda vez que los granos de plata reducida de la película, de color negro, destacan perfectamente sobre el fondo de la tinción del tejido subyacente. La FIG. 10 corresponde a una preparación con 15 días de exposición, en la que se aprecia de forma clara la distribución de radiactividad, incluso a este pequeño aumento. Finalmente la FIG. 11 corresponde al mismo tejido con una exposición de 30 días. Se manifiesta una clara sobreimpresión de la película fotográfica, que aparece totalmente ennegrecida sobre la mayor parte de los espacios limitados por los cordones celulares.



FIG. 9. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE HIGADO (x160), DESPUES DE 5 DIAS DE EXPOSICION.



FIG. 10. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE HIGADO (x160), DESPUES DE 15 DIAS DE EXPOSICION.

Con relación a la importancia del tratamiento de la película de emulsión líquida, consiguiendo a la impregnación de las preparaciones, pudiendo dar una idea las microfotografías de las FIGS. 12, 13 y 14. La primera de ellas corresponde a una preparación de riñón en la que se realizó un secado rápido de la película con la ayuda de un ventilador y se sometió a exposición durante 15 días. Se observa en ella un fondo realmente alto que da la impresión de una distribución de radiactividad indiscriminada, que dificulta la interpretación de la autorradiografía. La FIG. 13 corresponde a una preparación tratada igualmente mediante secado rápido de la película y sometida a una exposición de 30 días. El resultado es una sobreimpresión acusada y un fondo considerable que la inutilizan por completo. Finalmente, la preparación de la FIG. 14, de riñón al igual que las anteriores, se ha sometido a un secado lento de la película durante cuatro horas, y una exposición de 15 días; en ella se aprecia una distribución de actividad preferentemente en el espacio limitado por las dos hojas de las cápsulas de Bowman, en los espacios peritubulares y en la luz de los túbulos, todo ello con un fondo muy bajo. Como consecuencia de estas observaciones se han realizado todas las experiencias con un secado lento de la película y un tiempo de exposición de 15 días.

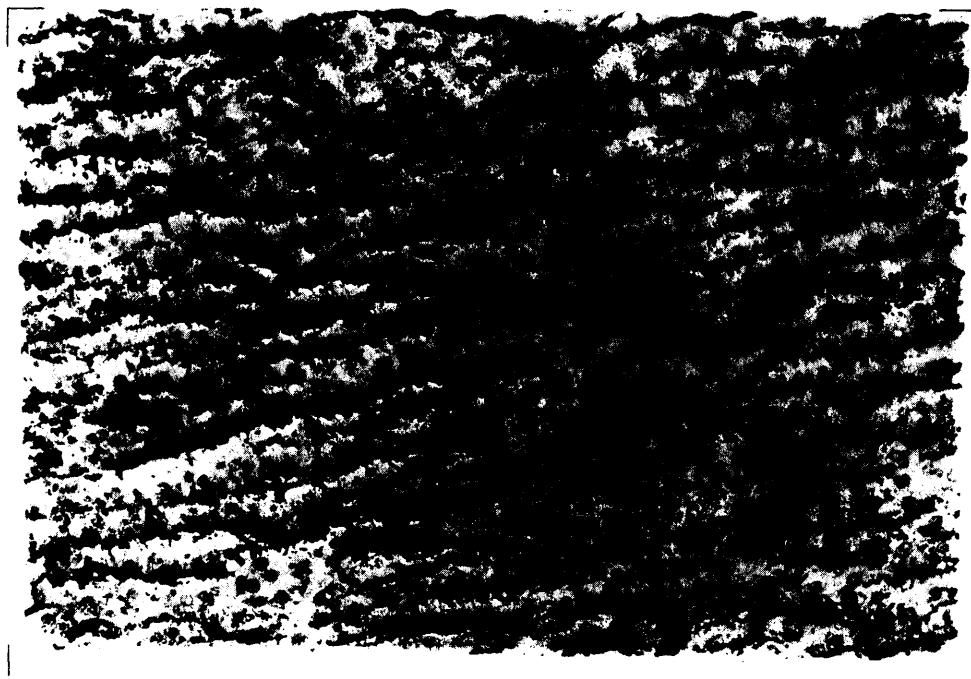


FIG.11. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE HIGADO (x160), DESPUES DE 30 DIAS DE EXPOSICION.



FIG.12. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE RIÑON (x400), CON SECADO RAPIDO DE LA PELICULA Y 15 DIAS DE EXPOSICION.



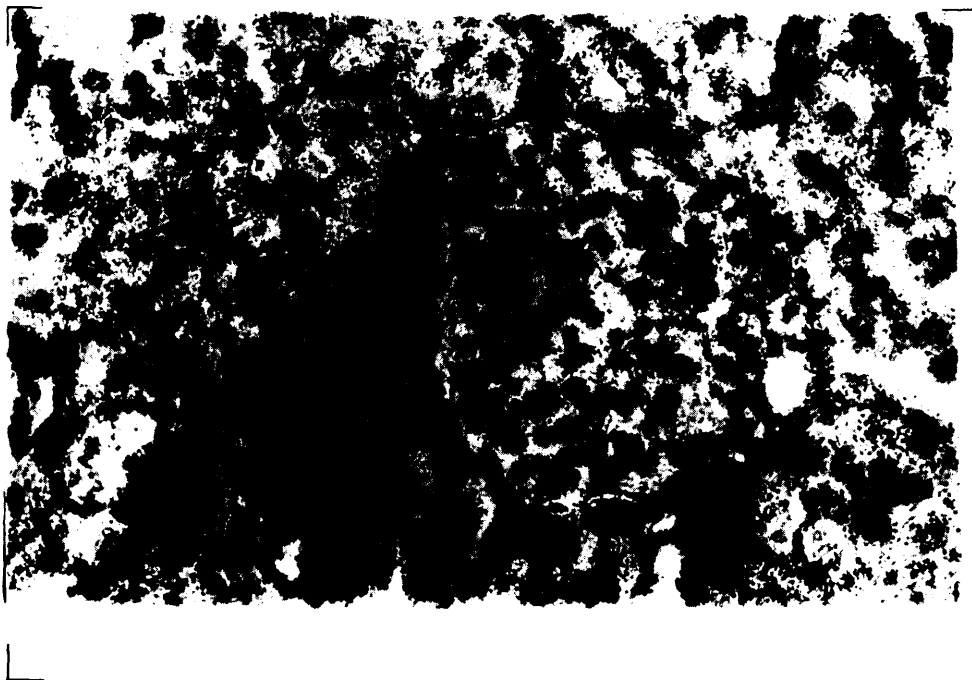


FIG.13. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE RIÑON (x 400), CON SECADO RAPIDO DE LA PELICULA Y 30 DIAS DE EXPOSICION.



FIG. 14. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE RIÑON (x 400), CON SECADO LENTO DE LA PELICULA Y 15 DIAS DE EXPOSICION.

El revelado de las autorradiografías se lleva a cabo por inmersión de las preparaciones durante 5 minutos, en una solución de la siguiente composición:

Sulfato de p-metilaminofenol (Elon) ..	2'2 g
Sulfito sódico anhidro .....	72'0 g
Hidroquinona .....	8'8 g
Carbonato sódico anhidro .....	48'0 g
Bromuro potásico .....	4'0 g
Agua destilada .....	1000 ml

Se detiene el revelado por inmersión en solución de ácido acético al 2% durante 30 segundos y finalmente, se tratan las preparaciones con una solución fijadora ácida (Kodak) durante 30 minutos.

La tinción histológica de las preparaciones se realiza por el procedimiento de Hematoxilina (Delafield)-Eoxina (107). Se ha comprobado previamente que la tinción resulta dañada si se realiza antes de los procesos de exposición, revelado y fijado de la película fotográfica. Por el contrario, la tinción posterior no plantea ningún problema, bastando con aumentar ligeramente los tiempos de actuación de los colorantes. Por último, las preparaciones se montan en Bálsamo de Canadá.

Las microfotografías se han obtenido en un fotomicroscopio tipo Zeiss Senior, sobre película Adox KB-14.

### 3. SINTESIS ORGANICA.

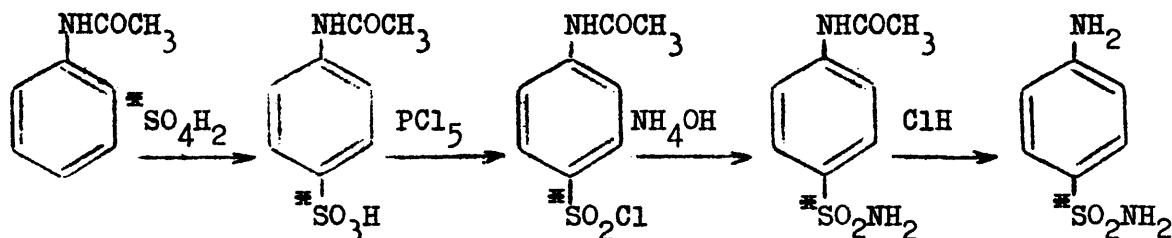
### 3. SINTESIS ORGANICA.

La síntesis de carbutamida-<sup>35</sup>S (1-butil-3-sulfanililurea-<sup>35</sup>S) se lleva a cabo según uno de los procedimientos descritos en la bibliografía para la síntesis del producto inactivo (114, 115), que consiste en la condensación de sulfanilamida y 1-butil-3-nitrourea, con la particularidad en este caso, de utilizar sulfanilamida-<sup>35</sup>S. Existen otros varios procedimientos (116, 117, 118) de preparación de carbutamida, posiblemente con mejor rendimiento, pero que no presentan la misma sencillez que el citado, factor que ha de tenerse en cuenta cuando se trata de sintetizar un producto marcado.

Consideramos a continuación, por separado, la preparación de sulfanilamida-<sup>35</sup>S y 1-butil-3-nitrourea.

#### 3.1. SINTESIS DE SULFANILAMIDA-<sup>35</sup>S.

Este compuesto se ha preparado a partir de acetanilida según la siguiente secuencia de reacciones (119) :



Describimos a continuación el procedimiento operativo seguido en cada una de las etapas.

### 3.1.1. Preparación de ácido N-acetilsulfanílico-<sup>35</sup>S.

En un vaso de precipitados de 25 ml se colocan 20 mCi de ácido sulfúrico - <sup>35</sup>S del 98% (Amersham) con actividad específica de 37 mCi/mM; se le añaden 2 ml de ácido sulfúrico del 98% como portador, exteriormente se enfría el vaso a 0°C y lentamente, con agitación, se le añaden 4 ml de anhídrido acético. A continuación y en pequeñas porciones, se adicionan 2 g de acetanilida cristalizada, manteniéndose la agitación durante todo el proceso. Finalizada la adición, la mezcla se calienta en baño maría a 95°C durante 30 minutos con lo que se logra la separación del ácido N-acetilsulfanílico - <sup>35</sup>S, que se completa por enfriamiento a 0°C y adición de 10 ml de acetona fría. El producto cristalino se separa por filtración, se lava con dos porciones de 1 ml de acetona fría y se seca bajo lámpara de infrarrojo. El rendimiento final del producto cristalizado es del 99% referido a la acetanilida empleada.

### 3.1.2. Preparación de ácido 4-acetamidobencenoclorosulfónico-<sup>35</sup>S.

En un vaso de precipitados de 50 ml, enfriado

exteriormente a 0°C, se mezclan 3,14 g de ácido N-acetilsulfanílico -  $^{35}\text{S}$  obtenidos en la etapa anterior y 6,28 g de pentacloruro de fósforo.

Iniciada la reacción, la mezcla se calienta suavemente en baño de vapor hasta la formación de una mezcla líquida homogénea, se enfría a 0°C y se le añaden aproximadamente 10 g de hielo para decomponer el exceso de pentacloruro de fósforo. De esta solución precipita el ácido 4-acetamidobenceno-clorosulfónico -  $^{35}\text{S}$ . El líquido que sobrenada se elimina por sifonación y se añaden nuevamente 10 g de hielo. Este producto sin más elaboración se utiliza en la etapa siguiente.

### 3.1.3. Preparación de N<sup>4</sup>-acetilsulfanilamida- $^{35}\text{S}$ .

La suspensión del compuesto sintetizado en la etapa anterior se coloca en un vaso de precipitados de 50 ml enfriado exteriormente a 0°C, se le añaden, en pequeñas porciones, 12 ml de hidróxido amónico concentrado. El pH final de la mezcla deberá ser francamente alcalino. Se calienta en baño maría a 95°C durante 30 minutos, separándose durante el calentamiento la N<sup>4</sup>-acetilsulfanilamida- $^{35}\text{S}$ , separación que se completa por enfriamiento y ajuste a pH 3 con ácido sulfúrico 2 N. Los cristales que se obtienen

se separan por filtración, se lavan con agua a 0°C y se secan bajo lámpara de infrarrojo.

El rendimiento de esta reacción es del 80% basado en el ácido-N-acetilsulfanílico -  $^{35}\text{S}$  preparado en la primera etapa.

El punto de fusión del producto sin purificar es de 212 - 218 °C.

#### 3.1.4. Preparación de sulfanilamida- $^{35}\text{S}$ .

En un vaso de precipitados de 25 ml se calientan a 95°C, durante 90 minutos, 2,50 g de  $\text{N}^4$ -acetilsulfanilamida -  $^{35}\text{S}$  y 15 ml de ácido clorhídrico al 10%. La solución se enfría posteriormente y se neutraliza en dos etapas, primero con hidróxido sódico 5 N hasta obtener un pH de 5 y finalmente con bicarbonato sódico hasta pH 7. Por enfriamiento a 0°C, se obtiene el producto cristalizado que se separa por filtración. El rendimiento obtenido en la síntesis de este compuesto se eleva al 90% referido a  $\text{N}^4$ -acetilsulfanilamida -  $^{35}\text{S}$ . El punto de fusión del producto crudo es de 160 - 163 °C.

### 3.2. SINTESIS DE 1-BUTIL-3-NITROUREA.

La preparación de este compuesto se lleva a cabo mediante el paso previo por nitrato de butilurea, que se transforma en 1-butil-3-nitrourea por simple deshidratación. En un vaso de 250 ml se disuelven 20 g de butilurea en 50 ml de agua y se añaden lentamente y con agitación 30 ml de ácido nítrico concentrado. La mezcla se enfría a  $-10^{\circ}\text{C}$ , cristalizando el nitrato de butilurea en láminas blancas que se separan por filtración. El punto de fusión del producto es de  $62-64^{\circ}\text{C}$  y el rendimiento de la reacción, del 80% referido a butilurea. Sin más purificación del mismo, se añade en pequeñas porciones, a lo largo de 30 minutos a un matraz de 250 ml provisto de fuerte agitación y enfriado exteriormente a  $-5^{\circ}\text{C}$ , que contiene 100 ml de ácido sulfúrico concentrado. Finalizada la adición de nitrato de butilurea, se continúa la agitación y enfriamiento durante 15 minutos más. Seguidamente se vierte el contenido del matraz sobre 300 g de hielo triturado, con lo que precipita una primera porción de 1-butil-3-nitrourea que se filtra inmediatamente. Las aguas madres se refrigeran durante varias horas a  $-10^{\circ}\text{C}$ , con lo que se separa una segunda porción del producto, que se recrystaliza en



etanol-agua (3:2). El rendimiento de 1-butil-3-nitrourea recristalizada, de p.f. 75-76°C, es del 73%, basado en la cantidad de butilurea utilizada.

3.3. SINTESIS DE CARBUTAMIDA-<sup>35</sup>S (1-BUTIL-3-SULFANILIL-UREA-<sup>35</sup>S).

En un matraz de 25 ml se calientan a reflujo durante 10 horas, 1'80 g de sulfanilamida-<sup>35</sup>S, 2 g de 1-butil-3-nitrourea, 1 g de carbonato sódico y 10 ml de agua. Finalizada la calefacción, se enfría el matraz en baño de hielo y se filtra la solución. El líquido se lleva a pH 3 con ácido clorhídrico (1:1), a fin de precipitar la carbutamida-<sup>35</sup>S, que se recristaliza en metanol-agua (1:1). El punto de fusión del producto recristalizado es de 144-145°C y el rendimiento del proceso es del 30%. La actividad específica del producto final es de 1'6 mCi/mMol.

3.4. SINTESIS DE N<sup>4</sup>-ACETILCARBUTAMIDA (1-BUTIL-3-(N<sup>4</sup>-ACETIL-SULFANILIL) UREA).

Se ha sintetizado este compuesto con el fin de utilizarlo como patrón en posteriores análisis cromatográficos dentro de la parte dedicada a experimentación en animales.

Se calientan a reflujo durante 30 minutos, 1 g de carbutamida, 8 ml de benceno y 1'5 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se enfría y se separa por filtración el producto cristalizado, que se recrystaliza en etanol-agua (1:1). La N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida, de p.f. 170-172°C, se obtiene con un rendimiento del 94%. El resultado del microanálisis cuantitativo es el siguiente:

Encontrado (%): C, 49'87; H, 6'18; N, 13'41; S, 10'05  
Calculado (%): C, 49'78; H, 6'06; N, 13'40; S, 10'14.

### 3.5. IDENTIFICACION Y CONTROL DE PUREZA.

La identificación y control de pureza química de la sulfanilamida-<sup>35</sup>S y carbutamida-<sup>35</sup>S sintetizadas se ha llevado a cabo mediante la determinación de puntos de fusión (microscopio "RCH", Kofler-Reichert), y cromatografía sobre papel y capa fina en varios disolventes, utilizando como patrones los correspondientes productos inactivos. En la TABLA X se reflejan los valores de R<sub>F</sub> obtenidos con diferentes soportes y disolventes y se incluyen también los correspondientes a la N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida sintetizada.

La pureza radioquímica de los compuestos marcados se determina por autorradiografía de los cromatogramas, en las condiciones especificadas en 2.3.1.

TABLA X. Disolventes y valores de  $R_f$  cromatográficos.

Producto	Soporte	Disolvente	$R_f$
Sulfanilamida- $^{35}\text{S}$	Whatman 1	1	0'50
"	Whatman 1	2	0'36
"	Whatman 1	3	0'65
"	Gel de Sílice (A)	1	0'74
"	Gel de Sílice (A)	2	0'48
Carbutamida- $^{35}\text{S}$	Whatman 1	1	0'34
"	Whatman 1	3	0'60
"	Gel de Sílice (A)	1	0'38
"	Gel de Sílice (A)	2	0'37
$\text{N}^4$ -acetilcarbutamida	Whatman 1	3	0'68
"	Gel de Sílice (A)	1	0'55

Disolventes:

1. Butanol-agua-hidróxido amónico conc.  
(40:30:10). (Eliminar la fase acuosa).
2. Cloroformo-metanol-hidróxido amónico conc.  
(63:30:4).
3. Isopropanol-hidróxido amónico conc.  
(3:1).

(A) Gel de sílice Camag DF-B.

#### 4. EXPERIMENTACION EN ANIMALES.

RESULTADOS.

#### 4. EXPERIMENTACION EN ANIMALES. RESULTADOS.

##### 4.1. DISTRIBUCION Y ACUMULACION EN ORGANOS.

Se ha estudiado la distribución de carbutamida-<sup>35</sup>S en diferentes órganos, en particular, aquellos relacionados con la asimilación, metabolismo y eliminación del fármaco por una parte, y su acción hipoglucemiante por otra. Pocos antecedentes se encuentran en la bibliografía sobre estudios similares realizados con sulfonilureas hipoglucemiantes. Citaremos el trabajo de Stuhlfauth (26), en el que estudia la distribución de carbutamida en varios órganos, aplicando para su detección y medida el método colorimétrico de Marshall Jr. (22) y cuyo resultado es la presencia de trazas del fármaco en cerebro y concentraciones relativamente altas en hígado, músculo y páncreas, en comparación con las encontradas en sangre. En la misma línea cabe reseñar el trabajo de Gerstemberg, Hasselblatt y Schmidt (120), que realizan un estudio de la distribución de tolbutamida marcada con <sup>35</sup>S, cuyo resultado es una acumulación del fármaco en hígado y bilis. Ningún estudio similar se ha llevado a cabo con carbutamida marcada, pese a que las técnicas radioquímicas tienen en este caso evidentes ventajas en cuanto a sencillez, sensibilidad y precisión.

Por nuestra parte, los órganos estudiados han sido hígado, riñón, páncreas, cápsulas suprarrenales, músculo cardíaco y músculo esquelético. Mediante las técnicas radiométricas de centelleo líquido descritas en (3.1.), es posible realizar medidas de los niveles de actividad en estos órganos, que pueden correlacionarse de manera inmediata con acumulación del radiofármaco en los mismos.

En estas experiencias se ha administrado a ratas, por vía intravenosa (vena caudal), una solución acuosa del radiofármaco y, a tiempos profijados después de la administración, se han sacrificado los animales y extraído los órganos objeto de estudio. En partes alícuotas de los mismos se han determinado los niveles de actividad, mediante solubilización y contaje. Las medidas se han referido a unidad de peso y a órgano completo. Se llevan a cabo series de experiencias en las cuales el animal es sacrificado a diferentes tiempos después de la administración de carbutamida-<sup>35</sup>S y se elaboran, para cada órgano en particular, gráficas de variación con el tiempo de los niveles de fármaco. A continuación se detallan el procedimiento y los resultados obtenidos.

#### 4.1.1. Administración de carbutamida-<sup>35</sup>S. Dosis utilizadas.

Como animales de experimentación se utilizan ratas blancas de ambos sexos y 180 g de peso aproximado. Las experiencias de distribución en órganos se han realizado en dos series, con diferentes dosis de carbutamida total administrada. En la primera serie, el material inyectado ha sido una solución en NaOH 0'1N de carbutamida-<sup>35</sup>S diluída con carbutamida fría, a la que se ajusta el pH a 8 con ClH diluído. La concentración en carbutamida total de esta solución es de 10'0 mg/ml. La actividad específica inicial es de 2'989  $\mu$ Ci/mg. En cada experiencia se administran 0'5 ml de solución, que contiene por lo tanto 14'944  $\mu$ Ci en 5'0 mg de carbutamida total, Si se expresa en forma de carbutamida total por Kg de peso corporal, la dosis es de 27'7 mg/Kg, que en lo sucesivo denominamos dosis A.

En la segunda serie de experiencias el material inyectado se prepara disolviendo carbutamida-<sup>35</sup>S y carbutamida fría en NaOH 0'1N hasta obtener una concentración de carbutamida total en la solución de 50'0 mg/ml. La actividad específica inicial de esta solución resulta ser de 30'742  $\mu$ Ci/ml, o lo que es equivalente, 0'614  $\mu$ Ci/mg. De esta solución se administran en cada experiencia 0'5 ml, lo que corresponde a 25'0 mg de carbutamida total que contienen 15'371  $\mu$ Ci. Expresado en forma de carbutamida total por Kg de peso corporal, la dosis es de 138'8 mg/Kg,

que en lo sucesivo denominamos dosis B.

En la preparación de las disoluciones inyectadas se han tenido en cuenta dos criterios: uno relacionado con la dosis radiactiva ( $\mu\text{Ci}$ ) y otro relacionado con la dosis farmacológica (mg de carbutamida total/Kg de peso corporal). Con relación al primero, se administran actividades suficientes para que den lugar a concentraciones radiactivas en los tejidos estudiados que puedan medirse por centelleo líquido. A este fin, las cantidades inyectadas están comprendidas entre 1 y 30  $\mu\text{Ci}$ . En cuanto al segundo, se han utilizado dos dosis que dan lugar a una respuesta diferente en lo que se refiere al nivel de glucosa en sangre, con el fin de analizar posibles diferencias en su comportamiento fisiológico que puedan aclarar en cierto modo su diferente respuesta terapéutica. Estas dosis son, como se ha dicho, la primera de 138'8 mg/Kg, que produce hipoglucemia marcada en ratas (10) (descenso del 30% en el nivel de glucosa en sangre a las 5 horas de una administración simple), mientras que la segunda, 27'7 mg/Kg, no produce hipoglucemia apreciable a las 5 horas de una administración simple, según se ha podido comprobar en 6 diferentes experiencias realizadas con esta dosis, en las que se determinó el nivel de glucosa en sangre por el método "Test enzimático en colorimetría" comercializado por Boehringer Mannheim.



Conviene resaltar aquí que, aunque en ambas series de experiencias la cantidad de carbutamida total administrada es diferente, la actividad inyectada es del mismo orden, aproximadamente 15  $\mu\text{Ci}$ . El resultado de las medidas por centelleo líquido nos da la concentración radiactiva en las muestras de tejidos estudiados. Estas concentraciones radiactivas pueden transformarse de manera inmediata en concentraciones de carbutamida total presente en la muestra de tejido, sin más que introducir el factor de actividad específica ( $\mu\text{Ci}/\text{mg}$  de carbutamida total) que corresponde a cada una de las dosis empleadas.

#### 4.1.2. Correlación de resultados.

En el apartado anterior se ha descrito la preparación de las soluciones de carbutamida utilizadas en las experiencias de distribución. Debe tenerse en cuenta que la actividad de estas soluciones decae rápidamente como consecuencia del período relativamente corto del  $^{35}\text{S}$ . En otras palabras, si en las experiencias de una misma serie se quiere mantener constante la dosis de carbutamida total administrada, no es posible mantener constante la actividad inyectada, puesto que ésta disminuye con el tiempo, salvo que se preparen soluciones nuevas en el momento de la inyección, por dilución de carbutamida- $^{35}\text{S}$  con la cantidad adecuada de carbutamida fría. Dado que los niveles de carbutamida en diferentes tejidos van a determinarse a través de una medida

de actividad, debe establecerse un procedimiento capaz de correlacionar los datos experimentales obtenidos en diferentes días y hacerlos comparables entre sí. En el mismo sentido aboga la necesidad de eliminar los errores motivados por la diferencia de peso de los animales de experimentación. Puesto que el parámetro fundamental no es la cantidad de fármaco inyectable, sino la concentración inicial del mismo en sangre, es fácil homologar los resultados de toda una serie de experiencias si se supone igual la concentración inicial de carbutamida-<sup>35</sup>S en sangre para todas ellas y se introducen posteriormente las correcciones oportunas. El razonamiento empleado es el siguiente: si a una rata de 180 g de peso se le inyectan 15  $\mu$ Ci de carbutamida-<sup>35</sup>S (independientemente de la dilución con carbutamida fría) y se supone que el peso de sangre en la rata es 1/20 del peso corporal, resulta que estos 15  $\mu$ Ci se distribuyen en 9 g de sangre total, o lo que es lo mismo, 8.5 ml de sangre (densidad de la sangre = 1.054 en rata). Un volumen de 0.010 ml de sangre contendrá 0.0176  $\mu$ Ci, y si se mide su actividad por centelleo líquido, teniendo en cuenta la eficiencia en el conteo (3.1.1.2.), debe dar un valor de 17.400 cpm corregidas por fondo y color (3.1.2.4.).

En la práctica, se inyecta la dosis A ó B de carbutamida marcada en cualquiera de las experiencias y después de 3 minutos se toman muestras de sangre de 0.010 ml.

Estas muestras, medida su actividad por centelleo líquido dan valores muy próximos a 15.000 cpm corregidas. En consecuencia, se han homologado todos los datos suponiendo que la concentración de carbutamida marcada en sangre a los 3 minutos de la administración es tal, que 0'010 ml de sangre dan 15.000 cpm. De esta forma, para cada serie de experiencias realizadas con las dosis fijadas, puede mantenerse constante el volumen de solución inyectado y por lo tanto, la cantidad total de carbutamida administrada, siendo así todos los resultados comparables y referibles a una misma dosis. En otras palabras, si en una determinada experiencia la muestra de sangre extraída da una actividad de 14.000 cpm, los resultados obtenidos en el conteo posterior de muestras de tejidos se multiplican por el factor  $15.000/14.000$ . Debe añadirse que esta determinación de la concentración en sangre del radiofármaco administrado, a los 3 minutos de la inyección, no sólo sirve para corregir la pérdida de actividad en el tiempo de la solución administrada (ésta podría ser determinada en la propia solución), sino que corrige además las pequeñas diferencias de peso de los animales y pone de manifiesto de manera inmediata cualquier anomalía en la administración intravenosa de la solución. La toma de muestra de sangre a los 3 minutos se hace en todos los casos por triplicado, con el fin de obtener un valor

significativo de la concentración radiactiva inicial en sangre. Sistemáticamente se rechazan las experiencias en las que este valor se aparta del fijado, 15.000 cpm, en más del 20%.

#### 4.1.3. Extracción de órganos y preparación y medida de muestras.

Los animales inoculados se sacrifican a tiempos fijos entre las 1 y 15 horas siguientes a la administración de carbutamida marcada. Se les extraen hígado, riñones, páncreas, cápsulas suprarrenales, corazón y un fragmento del biceps femoral, que se lavan brevemente en solución de ClNa al 0'9 % y se pesan. Partes alícuotas de los mismos se trasladan a viales de contaje y se determinan los niveles de actividad según se ha descrito en el apartado 3.1.2. Los valores determinados se refieren a unidad de peso y a órgano completo. Simultáneamente se toman muestras de sangre de 0'010 ml para determinar los niveles hemáticos de actividad remanente.

#### 4.1.4. Resultados.

Consideramos por separado los resultados correspondientes a las dos series de experiencias realizadas con las dosis A y B.

#### 4.1.4.1. Dosis no hipoglucémica (dosis A).

En el diagrama de la FIG. 15 se representa la distribución de niveles de actividad por gramo de tejido en los órganos estudiados, a las 3 horas de la administración; diagramas análogos pueden obtenerse para los demás tiempos.

En la TABLA XI se recogen los datos de actividad total en  $\mu\text{Ci}$ , acumulada a las 3 horas en los diferentes órganos y referidos a peso total de los mismos, que se expresan también como tanto por ciento de la actividad total inyectada. Los pesos de órganos completos se estiman como pesos medios de órganos frescos. En la FIG. 16 se representan estos resultados: la base de los rectángulos es proporcional al peso de los órganos completos y las alturas son proporcionales a la actividad en cpm por gramo de órgano; las áreas son por lo tanto proporcionales a la actividad acumulada en los órganos completos.

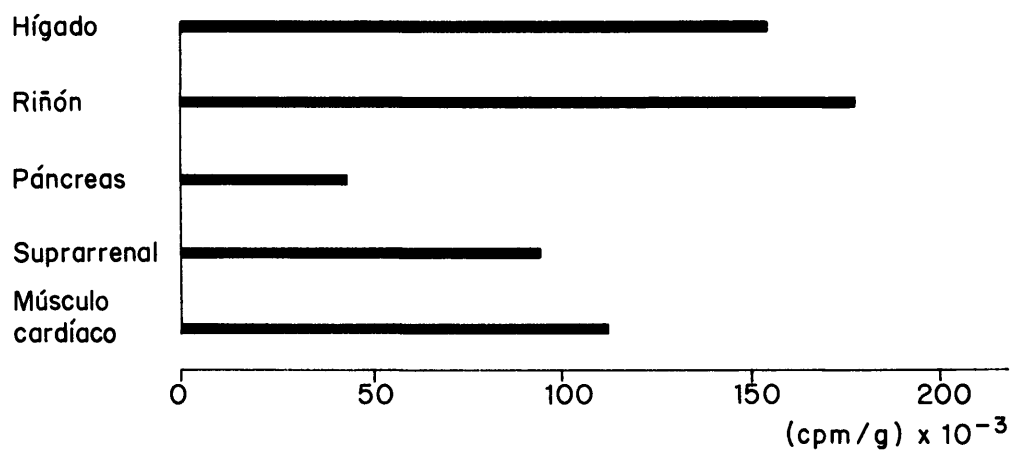


FIG. 15.— NIVELES DE RADIOACTIVIDAD A LAS 3 HORAS DE ADMINISTRAR UNA DOSIS A.

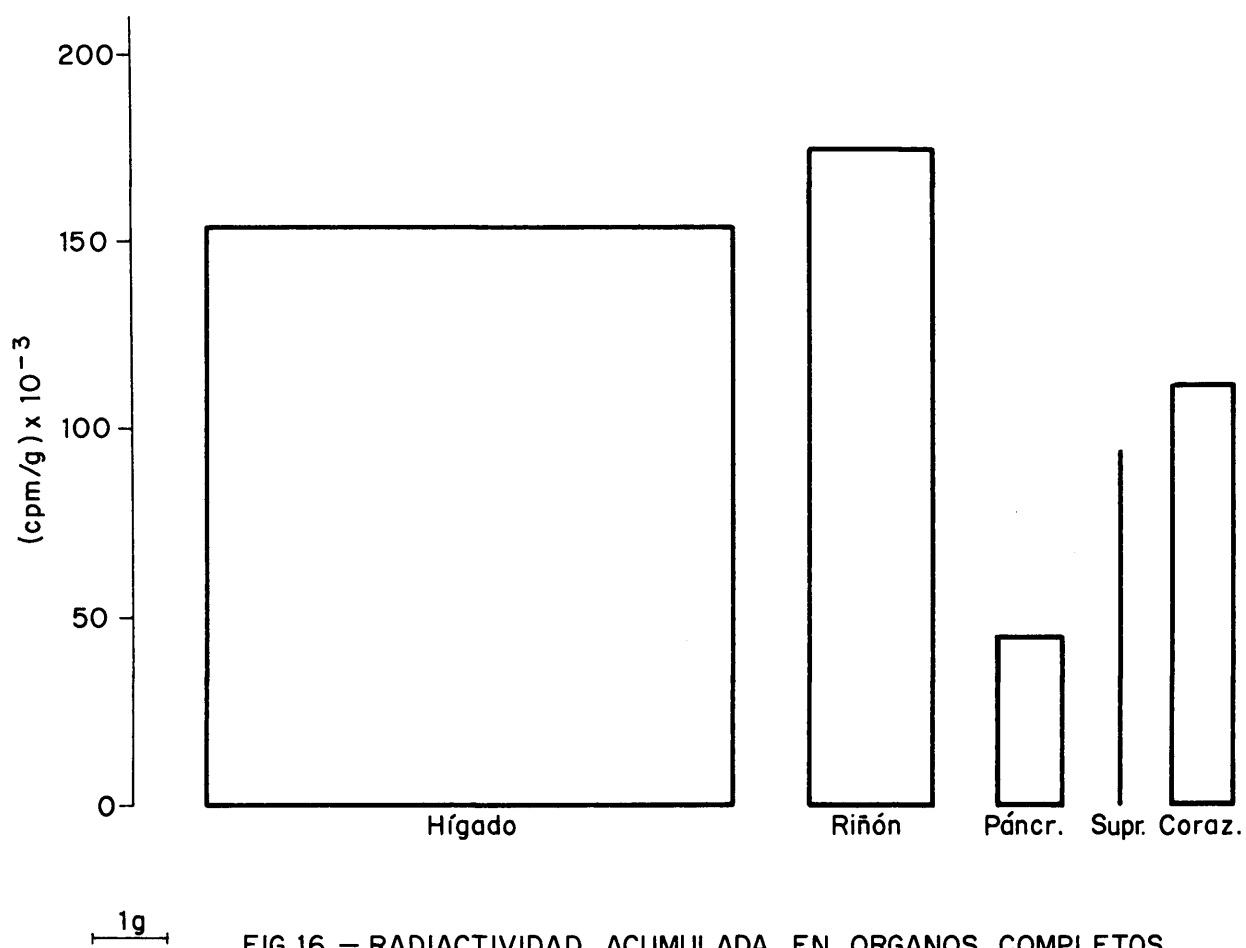


FIG. 16.— RADIOACTIVIDAD ACUMULADA EN ORGANOS COMPLETOS A LAS 3 HORAS DE ADMINISTRAR UNA DOSIS A.

TABLA XI. Actividad acumulada en órganos completos y sangre, a las 3 horas de administrar una dosis A de carbutamida marcada.

	Peso (g)	cpm/g	Actividad en órgano completo ( $\mu$ ci)	% de la actividad inyectada
HIGADO	7'0	153.600	1'14	8'388
RIÑON (2)	1'6	176.500	0'23	1'692
PANCREAS	0'8	42.900	0'04	0'003
SUPRARRENALES (2)	0'03	95.300	0'003	0'0002
CORAZON	0'7	112.700	0'08	0'006
SANGRE	9'0		1'22 <sup>a</sup>	8'977
(a) Actividad en el total de sangre.				

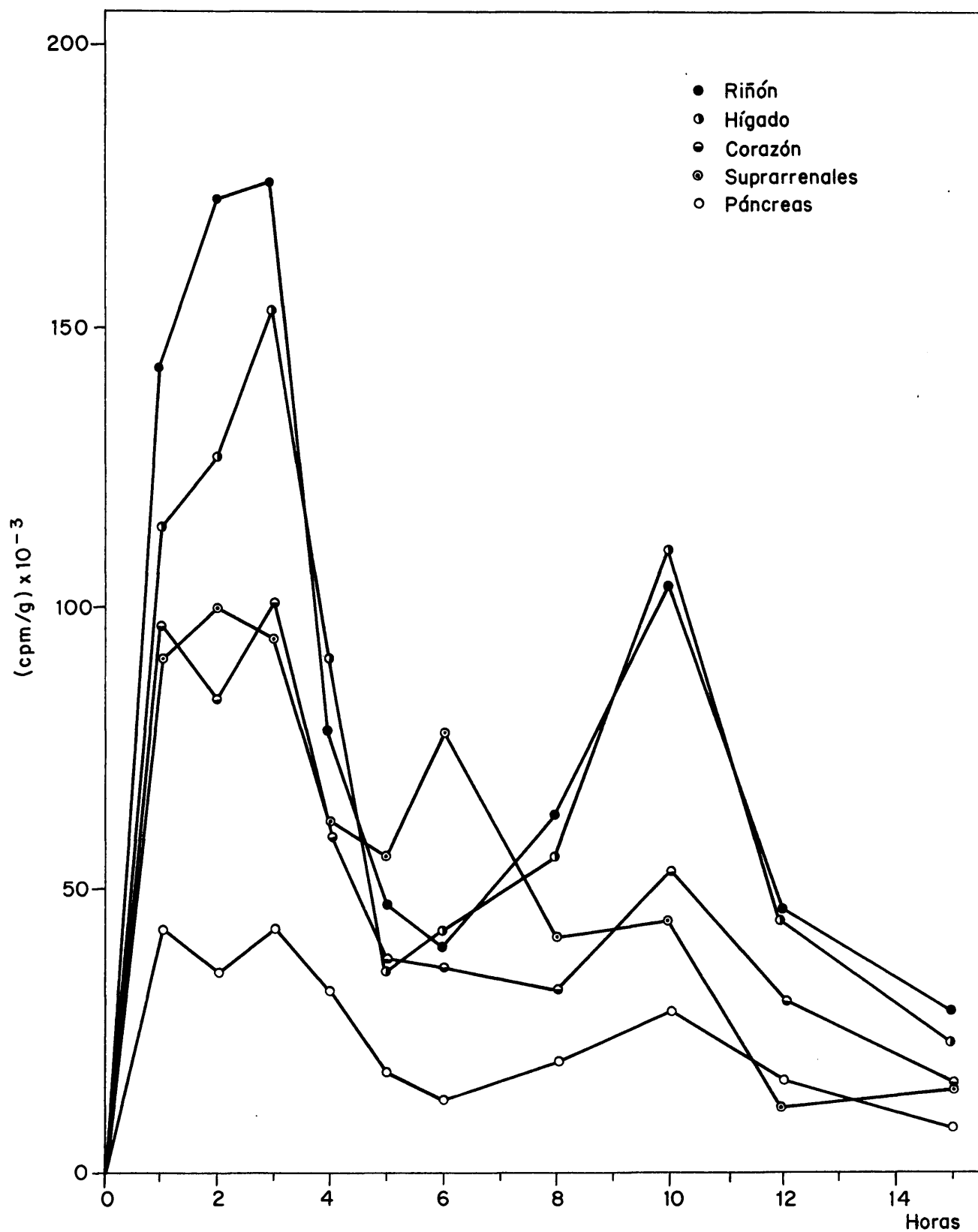


FIG.17. — DISTRIBUCION DE RADIATIVIDAD EN ORGANOS, A DIFERENTES TIEMPOS DESPUES DE ADMINISTRAR UNA DOSIS A.



Finalmente, en la FIG. 17, se representan los niveles de actividad en cpm/g de tejido fresco, para cada uno de los órganos, a diferentes tiempos después de la administración del radiofármaco. Los puntos experimentales son valores medios de tres o más experiencias realizadas en las mismas condiciones. Las desviaciones con respecto a los valores representados no son superiores en ningún caso al 10%.

#### 4.1.4.2. Dosis hipoglucémica (dosis B).

En el diagrama de la FIG. 18 se representa la distribución de niveles de actividad por gramo de tejido, a las 3 horas de la administración.

En la TABLA XII se recogen los datos referentes a actividad total en  $\mu\text{Ci}$  acumulada a las 3 horas, en los diferentes órganos y referidos al peso total de los mismos, que se expresan también como tanto por ciento de la actividad total inyectada. En la FIG. 19 se representan estos resultados.

TABLA XII. Actividad acumulada en órganos completos y sangre, a las 3 horas de administrar una dosis B de carbutamida marcada.

	Peso (g)	cpm/g	Actividad en órgano completo $\mu$ Ci.	% de la actividad inyectada
HIGADO	7'0	114.800	0'858	6'269
RINON (2)	1'6	189.900	0'322	2'369
PANCREAS	6'8	63.700	0'054	0'397
SUPRARRENALES (2)	0'03	96.600	0'003	0'0002
CORAZON	0'7	102.900	0'077	0'566
SANGRE	9'0		1'50 <sup>a</sup>	11'10
(a). Actividad en el total de sangre.				

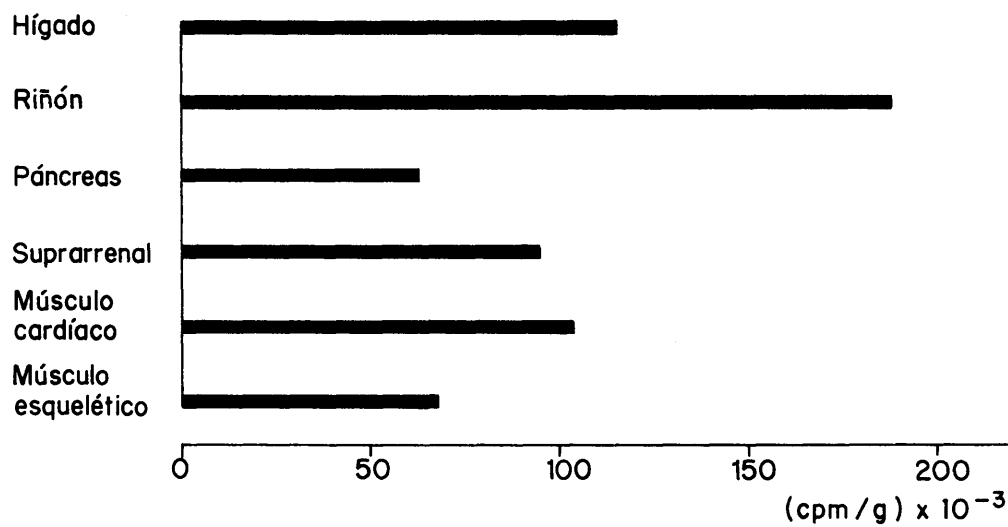


FIG.18. — NIVELES DE RADIOACTIVIDAD A LAS 3 HORAS DE ADMINISTRAR UNA DOSIS B.

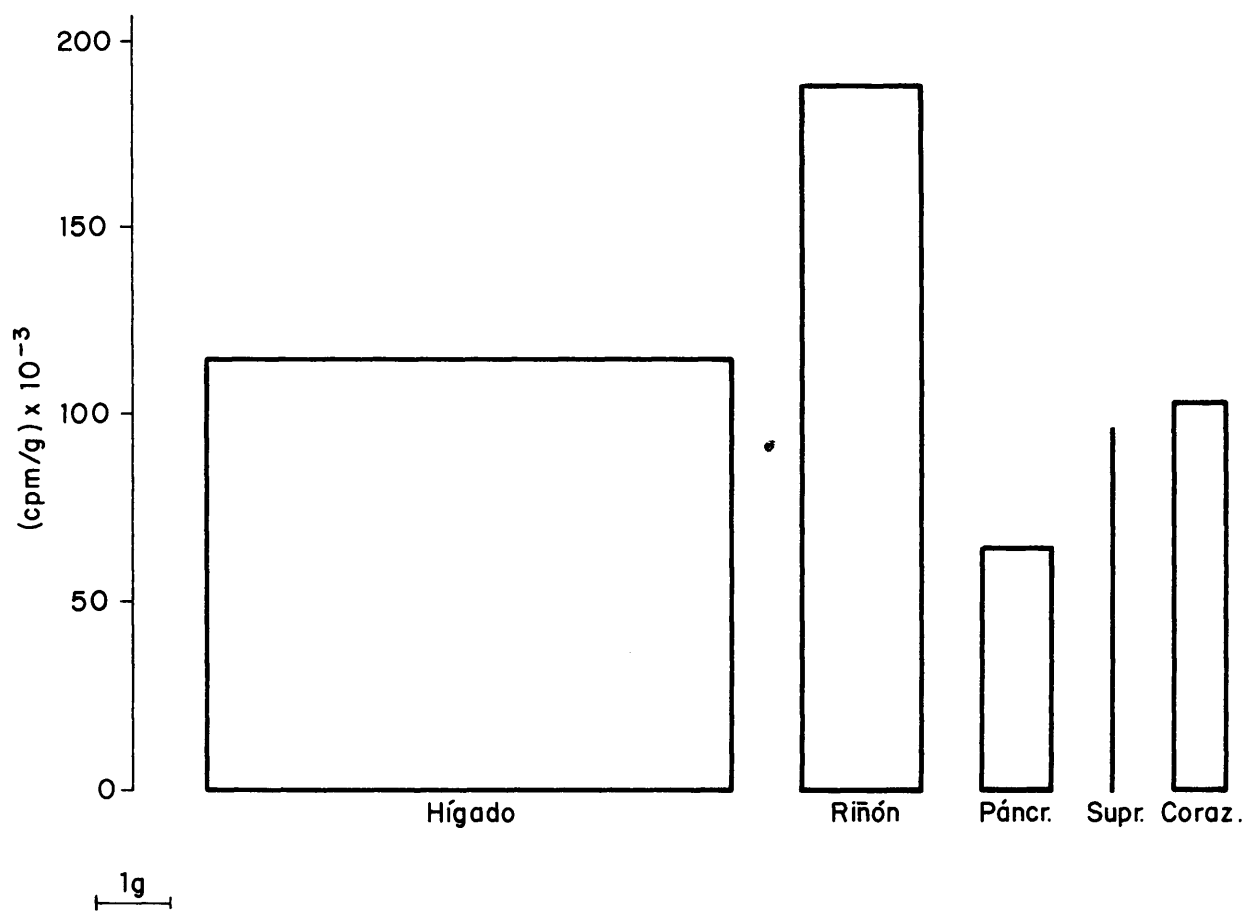


FIG.19. — RADIOACTIVIDAD ACUMULADA EN ORGANOS COMPLETOS A LAS 3 HORAS DE ADMINISTRAR UNA DOSIS B.

Debe recordarse que las medidas son de actividad, es decir, se registra la presencia en tejidos de carbutamida- $^{35}\text{S}$  y no carbutamida total. A este respecto, aunque la cantidad de carbutamida- $^{35}\text{S}$  administrada en ambas series de experiencias es la misma (4.1.1.), la cantidad de carbutamida fría, y por lo tanto de carbutamida total, es diferente en ambas dosis.

Por último, si se representan los niveles de actividad en los diferentes órganos en función del tiempo, se obtienen las gráficas de la FIG. 20. Los puntos representados son valores medios de tres o más experiencias realizadas en las mismas condiciones. Las desviaciones con respecto a los valores representados no son en ningún caso superiores al 10%.

#### 4.1.5. Niveles hemáticos de actividad.

Simultáneamente al estudio de distribución en diferentes órganos del radiofármaco inyectado, se determina la actividad remanente en sangre a diferentes tiempos para cada una de las dosis A y B preparadas según se describe en 3.1.1. Las medidas se realizan sobre muestras de 0.010 ml de sangre, tomadas en el momento de sacrificar a los animales; el nivel de actividad en cpm se refiere

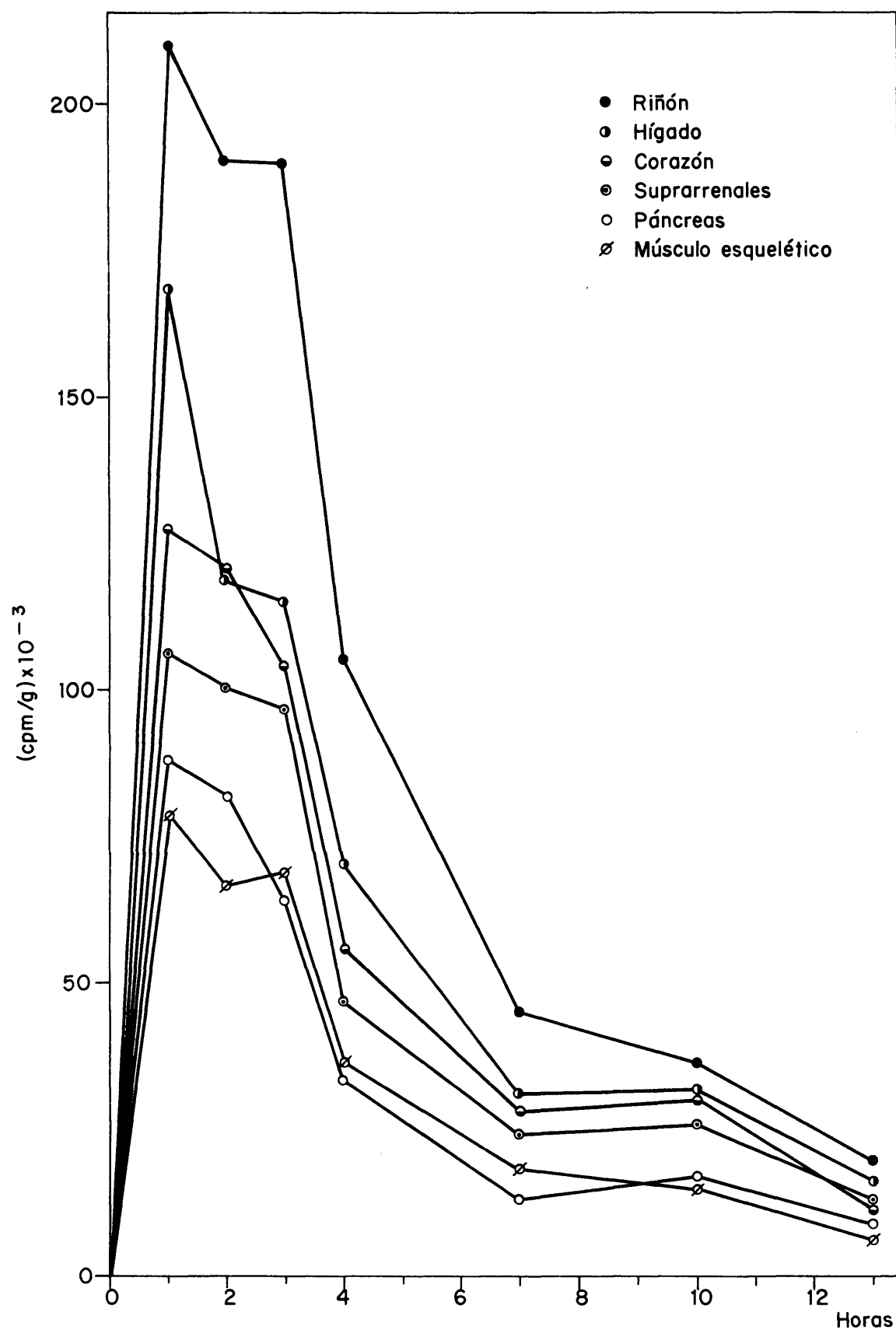


FIG. 20.— DISTRIBUCION DE RADIATIVIDAD EN ORGANOS, A DIFERENTES TIEMPOS DESPUES DE ADMINISTRAR UNA DOSIS B.

al inicial, es decir, 15.000 cpm/0.140 ml, y se expresa como tanto por ciento del mismo. En la FIG. 21 se representa la variación de la actividad en sangre, después de la administración de una dosis A. Análogamente, en la FIG. 22, se representan los resultados obtenidos con una dosis B. Por último, en las FIGS. 23 y 24, se representan con fines comparativos, las concentraciones radiactivas en hígado y sangre, para cada una de las dosis, en función del tiempo. Los datos vienen expresados en cpm/g de tejido o sangre.

#### 4.1.6. Discusión de resultados.

Estas primeras experiencias, en las que se estudia la distribución de niveles de actividad en diferentes órganos o sistemas y la variación de estos niveles en el tiempo, permiten hacer ya algunas observaciones en cuanto a la ruta fisiológica seguida por la carbutamida marcada administrada.

Los niveles de actividad por gramo de tejido, tanto para la dosis A (FIG. 15) como para la dosis B (FIG. 18) muestran, a las tres horas, una concentración máxima en riñón o hígado, que cabe atribuir en principio a la actuación de estos órganos en el proceso de eliminación fisiológica del fármaco. Resultan en cierto modo sorprendentes los niveles de actividad encontrados en el

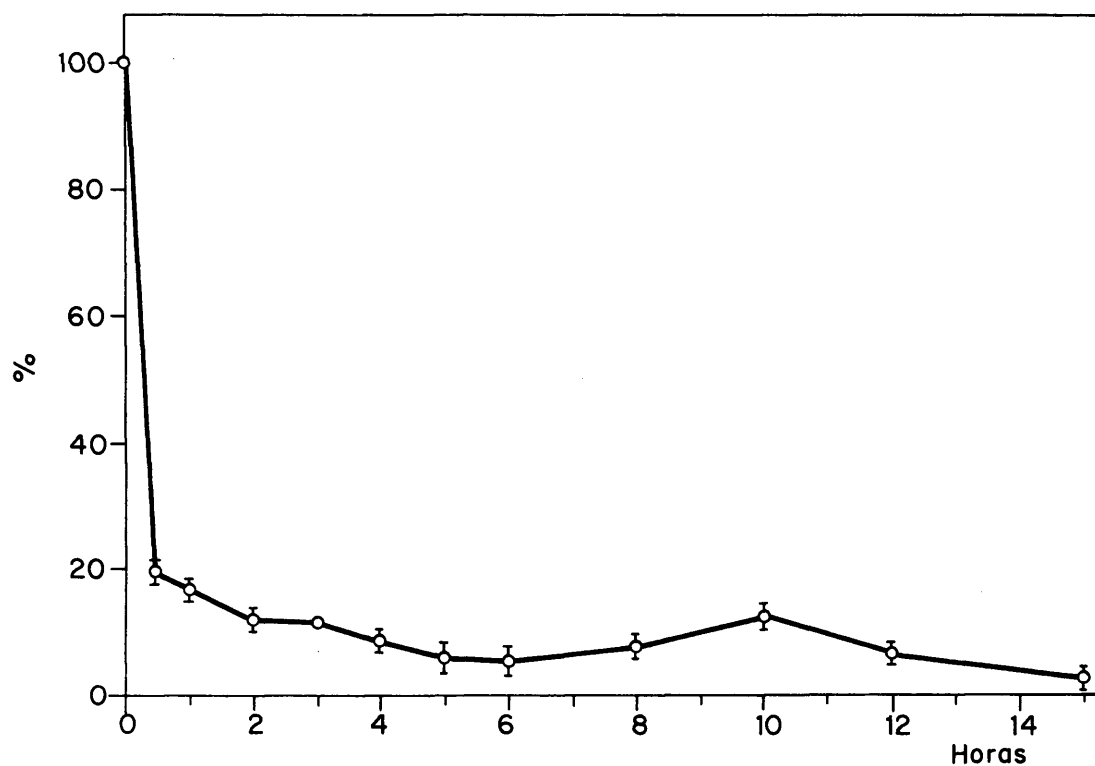


FIG.21.— NIVELES HEMATICOS DE RADIATIVIDAD, DESPUES DE ADMINISTRAR UNA DOSIS A, EXPRESADOS EN % DEL NIVEL INICIAL.

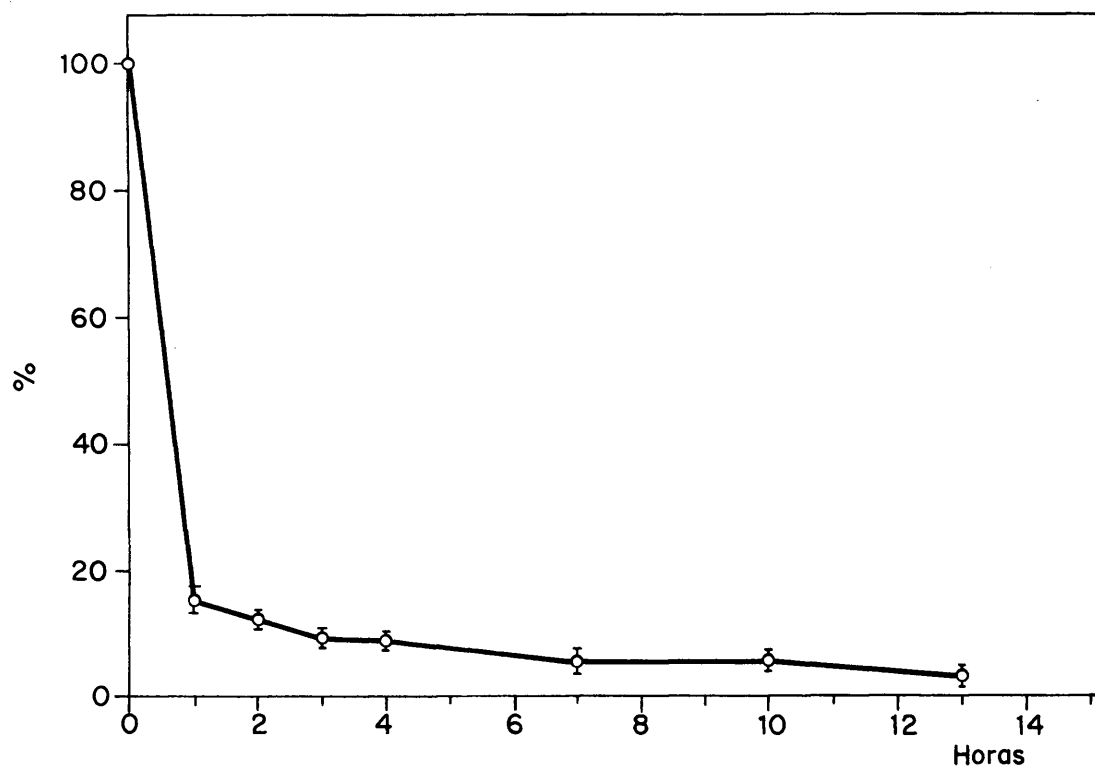


FIG.22.— NIVELES HEMATICOS DE RADIATIVIDAD, DESPUES DE ADMINISTRAR UNA DOSIS B, EXPRESADOS EN % DEL NIVEL INICIAL.

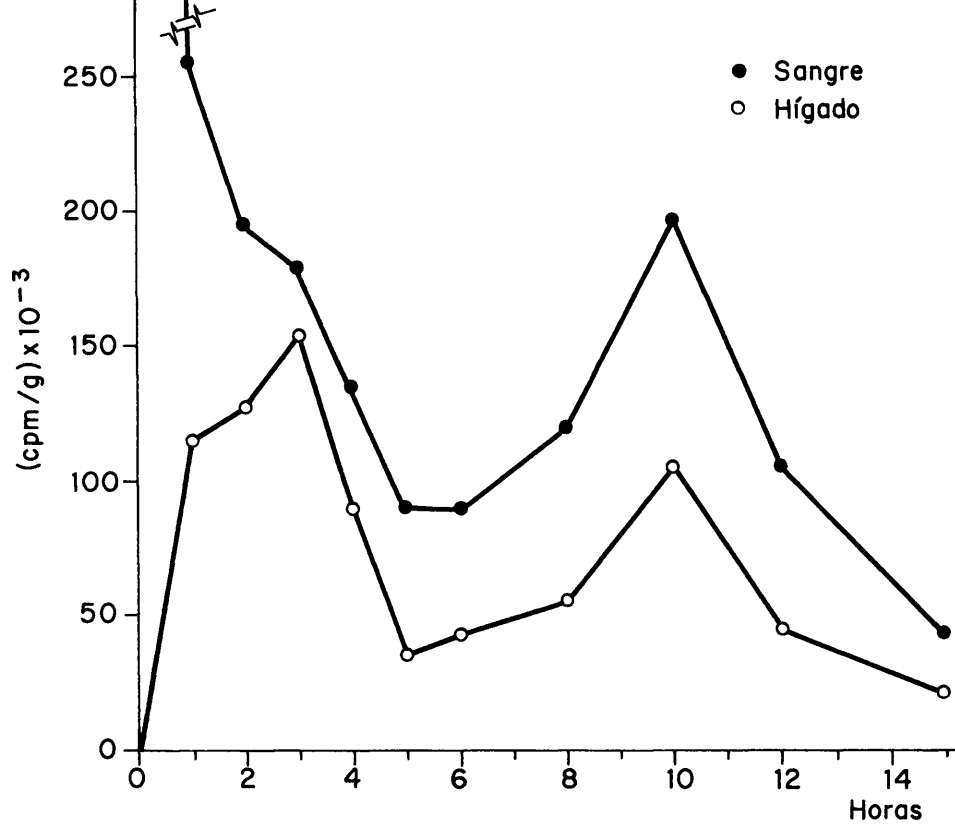


FIG. 23.-CONCENTRACION RADIATIVA EN SANGRE Y EN HIGADO DESPUES DE ADMINISTRAR UNA DOSIS A.

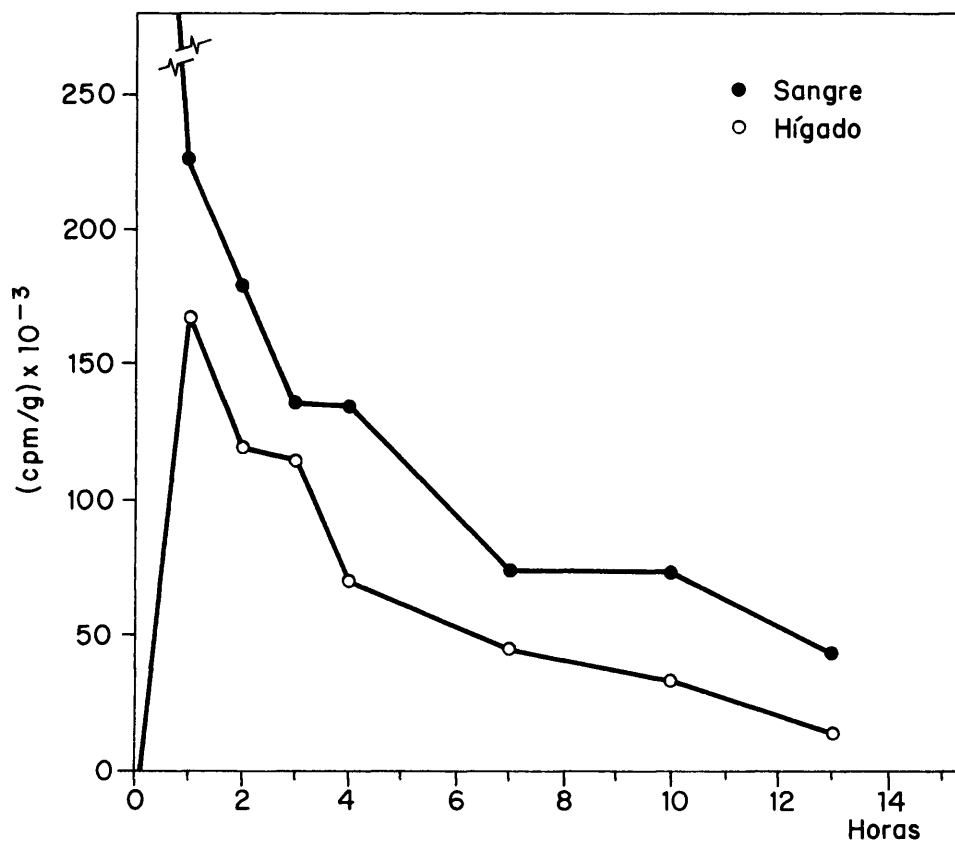


FIG. 24.-CONCENTRACION RADIATIVA EN SANGRE Y EN HIGADO DESPUES DE ADMINISTRAR UNA DOSIS B.



músculo cardíaco, que parecen sugerir una fijación significativa de la carbutamida a este tipo de tejido; por el contrario, la concentración en páncreas es relativamente baja, lo cual choca en principio con una posible interpretación del mecanismo de acción hipoglucemiante de la carbutamida a través de una actuación directa sobre las células beta secretoras de insulina. Debe tenerse en cuenta sin embargo que los islotes de Langerhans no suponen más que el 1'5% del total del órgano y que las células beta insulinosecretoras representan aproximadamente el 70% del número total de células de los islotes, por lo que estos datos de niveles de actividad referidos al conjunto del órgano, no son significativos si se quieren relacionar con la glándula endocrina pancreática.

En cuanto a las cápsulas suprarrenales, los niveles de actividad por gramo de tejido son relativamente altos, sin que estas experiencias iniciales permitan por el momento una interpretación de estos resultados. Conviene señalar no obstante, que en las diferentes experiencias realizadas en las mismas condiciones, los datos obtenidos referentes a cápsulas suprarrenales, han sido siempre los menos reproducibles.

Si consideramos ahora la variación en el tiempo de estos niveles de actividad por gramo de tejido, se aprecia, para la dosis A (FIG. 17), un descenso general en el

intervalo que va de las 4 a las 6 horas, seguido de un nuevo incremento entre las 8 y 12 horas, muy marcado sobre todo en hígado y riñón.

Este aumento de actividad entre las 8 y 12 horas, después de un primer descenso, cabe atribuirlo a un proceso de recirculación del fármaco. Como es sabido la carbutamida se excreta en bilis (lo cual, junto a la excreción urinaria, justifica el primer descenso de niveles de actividad) pero se reabsorbe casi totalmente por la circulación enterohepática. Esta reabsorción puede ser la causa del aumento general entre las 8 y 12 horas, seguido finalmente de un nuevo descenso para tiempos superiores.

Por otra parte, la misma variación de concentraciones estudiada para una dosis B (FIG. 20), muestra un descenso prácticamente continuo, lo cual hace pensar que los niveles de fármaco, bastante más altos como consecuencia de una dosis cinco veces mayor de carbutamida total, enmascaran el efecto de recirculación que se hace patente con una dosis A.

Finalmente, las gráficas de variación de los niveles hemáticos de actividad con el tiempo, tanto para la dosis A (FIG. 21) como para la B (FIG. 22), ponen de manifiesto un rápido descenso, hasta valores del 17 y 15% de la actividad inyectada, en la primera hora después de la

administración, seguido de un descenso lento a lo largo de un período relativamente prolongado, llegando a valores del orden del 3 al 5% después de unas 15 horas.

#### 4.2. EXCRECION.

Con el propósito de determinar la forma y velocidad de excreción de la carbutamida, se evalúa, en una serie de experiencias, la actividad excretada por heces y orina, después de la administración de carbutamida marcada. Con este fin, a tres ratas de 180 g de peso se les inyecta por vía intravenosa 0'64 ml de solución de carbutamida-<sup>35</sup>S de actividad específica 2'989  $\mu$ Ci/mg y concentración 10 mg/ml.

Los animales se colocan en jaulas metabólicas y, a intervalos entre las 0 y las 68 horas, se recogen muestras de orina y heces, de las que se determina el volumen y peso, respectivamente. Las muestras de heces de cada animal en particular, se secan a 125°C durante 4 horas y, una vez secas, se pesan. En partes alícuotas de las mismas, se determina la actividad mediante contaje por suspensión de CAB-O-SIL y se evalúa la eficiencia del mismo mediante patrón interno.

A su vez, de todas las muestras de orina se toman alícuotas de 0'010 ml y se determina por contaje la concentración radiactiva. Conocido el volumen de cada muestra, se calcula la actividad global excretada en los diferentes intervalos de tiempo. A partir de estos datos, se determina la actividad acumulativa excretada desde las 0 hasta las 68 horas y se elabora la correspondiente curva exponencial de eliminación.

#### 4.2.1. Excreción en heces. Resultados.

En la TABLA XIII se recogen los datos referentes a la determinación de actividad en heces. Puede apreciarse que la actividad excretada por esta vía es relativamente pequeña: 0'48  $\mu$ Ci, frente a los 19'15  $\mu$ Ci inyectados, lo cual supone un 2'4 % de la actividad total. Los datos de la TABLA XIII corresponden a uno de los animales ensayados;

TABLA XIII. Actividad excretada en heces, Respues de administrar 19'15  $\mu$ Ci de carbutamida marcada.

Muestra	Intervalo de tiempo (horas)	Peso seco (gramos)	Actividad excretada ( $\mu$ Ci)	Total acumulativo ( $\mu$ Ci)
1	0 á 15	0'6421	0'23	0'23
2	15 á 30	0'1390	0'13	0'36
3	30 á 68	0'5586	0'12	0'48

los valores correspondientes de tanto por ciento de eliminación por heces para las otras dos experiencias han sido 2'6 y 2'0 respectivamente.

#### 4.2.2. Excreción en orina. Resultados.

Referente a la eliminación en orina, en la TABLA XIV se sumarizan los resultados obtenidos, que son

valores medios de las tres experiencias realizadas en las mismas condiciones. Se determina la concentración radiactiva en las muestras correspondientes a los diferentes intervalos, mediante medida de 0'010 ml de cada muestra, por centelleo líquido. Conocido el volumen de las diferentes muestras y la eficiencia del contaje, se deduce la actividad excretada en cada intervalo de tiempo, expresada en  $\mu\text{Ci}$ . Finalmente, teniendo en cuenta que la actividad específica de la carbutamida- $^{35}\text{S}$  inyectada es de  $2'989 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ , se calcula la cantidad acumulativa de carbutamida total eliminada a diferentes tiempos después de su administración, expresada en mg. Debe advertirse que el significado de estos valores es de cantidades de carbutamida, referidas a los 6'4 mg inyectados, que son eliminadas como tal carbutamida o metabolizada como veremos más adelante.

Si se representan los mg de carbutamida eliminados a diferentes tiempos después de su administración, en función del tiempo, se obtiene la serie de puntos de la FIG. 25, que pueden ajustarse a una curva del tipo normal  $C = C_0 (1 - e^{-Kt})$ , donde  $C_0$  es la cantidad de fármaco administrada y  $C$  es la cantidad excretada al cabo de un tiempo  $t$ . Calculado el parámetro  $K$ , la curva ajustada resulta ser

$$C = C_0 (1 - e^{-0'0808 t}).$$

TABLA XIV. Eliminación de carbutamida marcada en orina.

Intervalo de tiempo (horas)	Actividad excretada ( $\mu$ Ci)	Actividad acumulati- va excreta- da ( $\mu$ Ci)	Cantidad acumula- tiva de carbuta- mida eliminada. (mg)
0 a 4	6'681	6'081	2'034
4 a 9	4'059	10'140	3'543
9 a 20	6'059	16'199	5'570
20 a 27	0'926	17'125	5'880
27 a 46	1'325	18'450	6'323
46 a 54	0'049	18'499	6'340
54 a 68	0'023	18'522	6'348

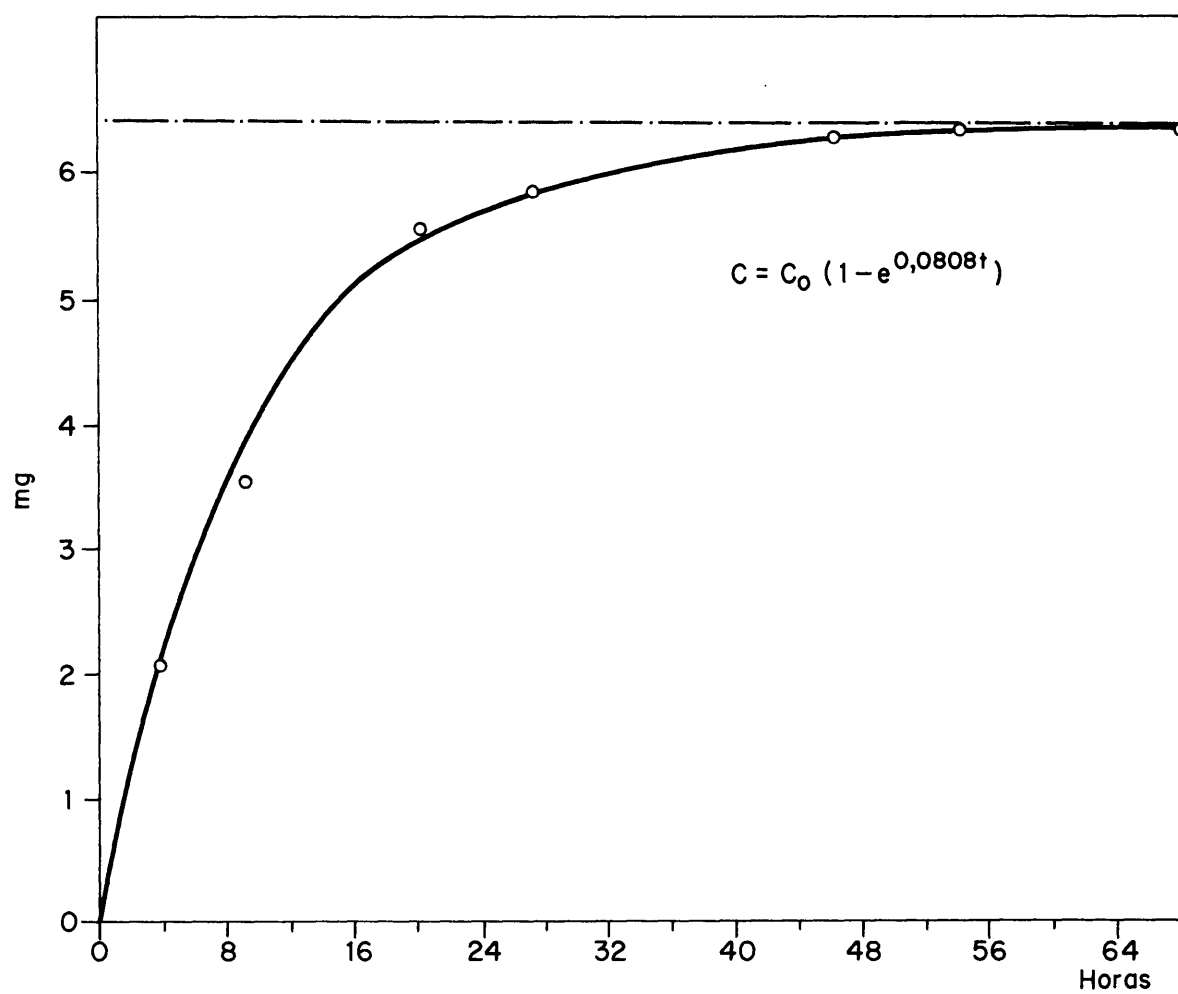


FIG.25. - EXCRECION ACUMULATIVA DE CARBUTAMIDA EN ORINA.



La bondad del ajuste puede estimarse suficiente, toda vez que la  $\chi^2$  de Pearson calculada es 0'103, siendo el valor de  $\chi^2_{99\%}$  tabulado, para 5 grados de libertad, 0'554.

#### 4.2.3. Identificación de metabolitos en orina.

La identificación de posibles metabolitos en orina se lleva a cabo mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice y posterior autorradiografía de los cromatogramas obtenidos, tal como se ha descrito en 2.3.1.

Ratas a las que se les inyecta por vía intravenosa dosis A o B de carbutamida marcada, se trasladan a jaulas metabólicas y se recogen seguidamente muestras de la orina excretada. Estas muestras se cromatografían como tales, o bien se someten a extracción previa con acetado de etilo y posterior cromatografía de los extractos orgánicos obtenidos. Conjuntamente se desarrollan en el mismo cromatograma patrones de carbutamida, N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida y sulfanilamida, como referencia. Asimismo se cromatografían simultáneamente orina blanco de un animal intacto y una disolución de los patrones en orina blanco, con el fin de detectar cualquier posible influencia del contenido normal de la orina en el desplazamiento cromatográfico de dichos compuestos. Se utiliza preferentemente, como fase

móvil, la integrada por n-butanol-agua-hidróxido amónico concentrado (40:30:10) (eliminar la fase acuosa). En la FIG. 26 se muestra una fotografía de uno de los cromatogramas obtenidos con esta fase móvil. Los desarrollos numerados corresponden a las siguientes muestras:

- 1) Orina blanco
- 2) Orina excretada a las 2 horas de administrar una dosis B de carbutamida marcada.
- 3) Patrones de carbutamida, N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida y sulfanilamida, disueltos en orina blanco.
- 4) Orina excretada a las 6 horas de administrar una dosis B de carbutamida marcada.
- 5) Patrones de carbutamida, N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida y sulfanilamida, disueltos en acetona.
- 6) Extracto en acetato de etilo de orina excretada a las 2 horas de administrar una dosis B de carbutamida marcada.

Los valores de  $R_f$  de los patrones en la fase móvil citada son, respectivamente:

Carbutamida .....	0'38
N <sup>4</sup> -acetilcarbutamida .....	0'55
Sulfanilamida .....	0'74

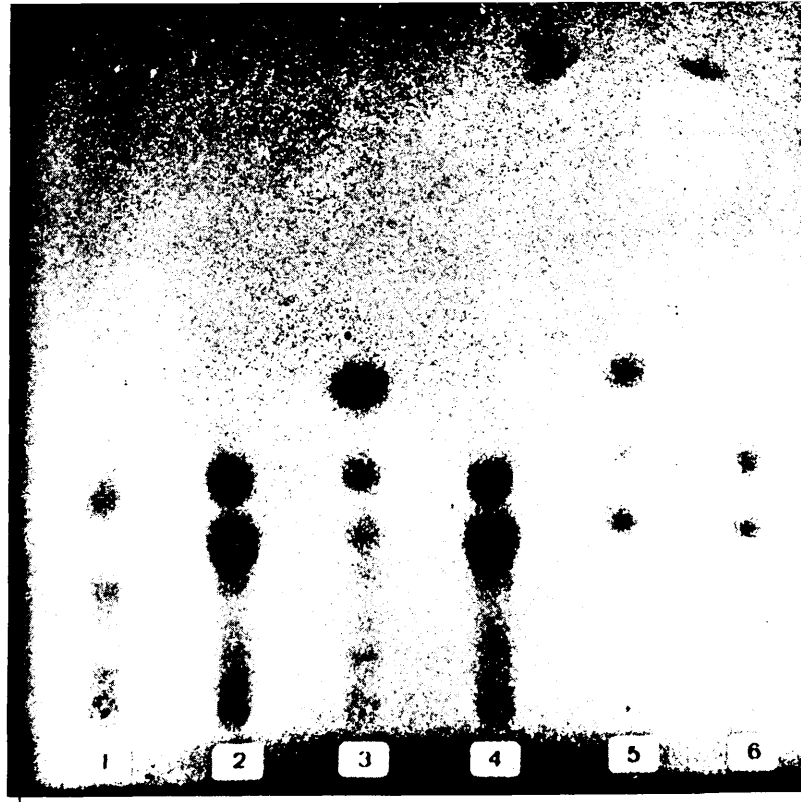


FIG. 26.—ANALISIS CROMATOGRAFICO DE ORINA, DÉSPUES DE ADMINISTRAR CARBUTAMIDA MARCADA.

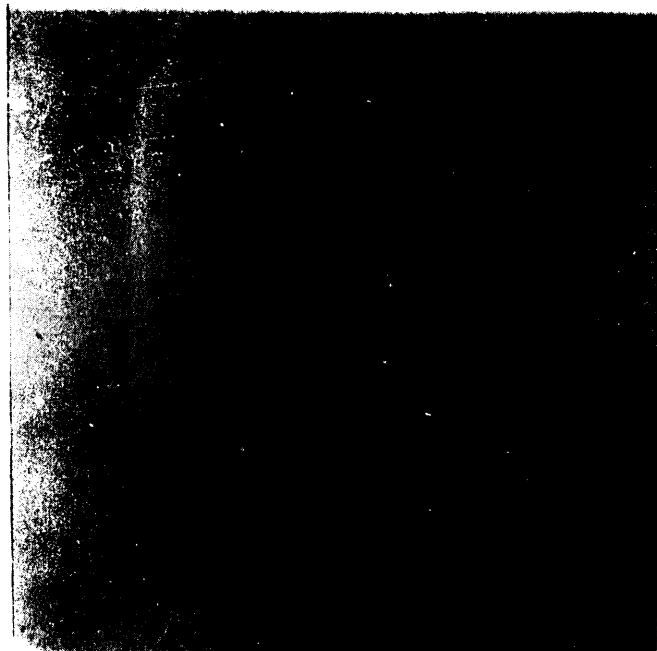


FIG. 27. — AUTORADIOGRAFIA DEL CROMATOGRAMA DE LA FIG. 26.

Como puede apreciarse, las muestras de orina contienen cantidades importantes de carbutamida y  $N^4$ -acetilcarbutamida, según se deduce de la comparación de valores de  $R_f$  con los correspondientes a los patrones. Ambos compuestos aparecen también en el desarrollo del extracto en acetato de etilo. El desarrollo nº 3 demuestra que no hay interferencia importante, desde el punto de vista del desplazamiento cromatográfico, entre los compuestos investigados y el contenido normal de la orina.

Esta identificación se confirma por autorradiografía de los cromatogramas. En la FIG. 27 se muestra el positivo de la autorradiografía del cromatograma de la FIG. 26, obtenida después de 72 horas de exposición a una película de rayos-X tipo Kodak RB-54. En ella se observa que, en los desarrollos nº 2, 4 y 6, prácticamente el total de la radiactividad se encuentra en las localizaciones correspondientes a carbutamida y  $N^4$ -acetilcarbutamida.

#### 4.2.4. Determinación cuantitativa de metabolitos.

La evaluación cuantitativa de carbutamida y su único metabolito,  $N^4$ -acetilcarbutamida, excretados en la orina de ratas tratadas con carbutamida marcada, se lleva a cabo por medida de actividad de las localizaciones cromatográficas correspondientes, después del desarrollo cro-

matográfico de muestras de orina en las condiciones descritas en 4.2.3. Las medidas se realizan mediante conteo por centelleo líquido, previa suspensión del soporte de gel de sílice en CAB-O-SIL, tal como se describió en 2.1. 2.6.

El análisis cuantitativo se lleva a cabo para las dos dosis A y B de carbutamida marcada que se vienen utilizando y, para cada una de las dosis, a diferentes tiempos después de su administración.

Los resultados se reflejan en las gráficas de la FIG. 28 (dosis A) y de la FIG. 29 (dosis B). En estas gráficas, se han representado las concentraciones radiactivas totales (cpm/0.010 ml) en las muestras de orina excretadas a diferentes tiempos después de la administración de carbutamida marcada. Como resultado del análisis cromatográfico, esta actividad se ha desglosado, para cada una de las muestras, en las fracciones correspondientes a carbutamida- $^{35}\text{S}$ ,  $\text{N}^4$ -acetilcarbutamida- $^{35}\text{S}$  y resto no identificado. Los datos representados, que corresponden a sendas experiencias con las dosis A y B, están ratificados por otras dos experiencias más realizadas en las mismas condiciones y en las que se han encontrado resultados concordantes con los representados. Puede observarse que el grado en que se produce la acetilación de la carbutamida inyectada, varía

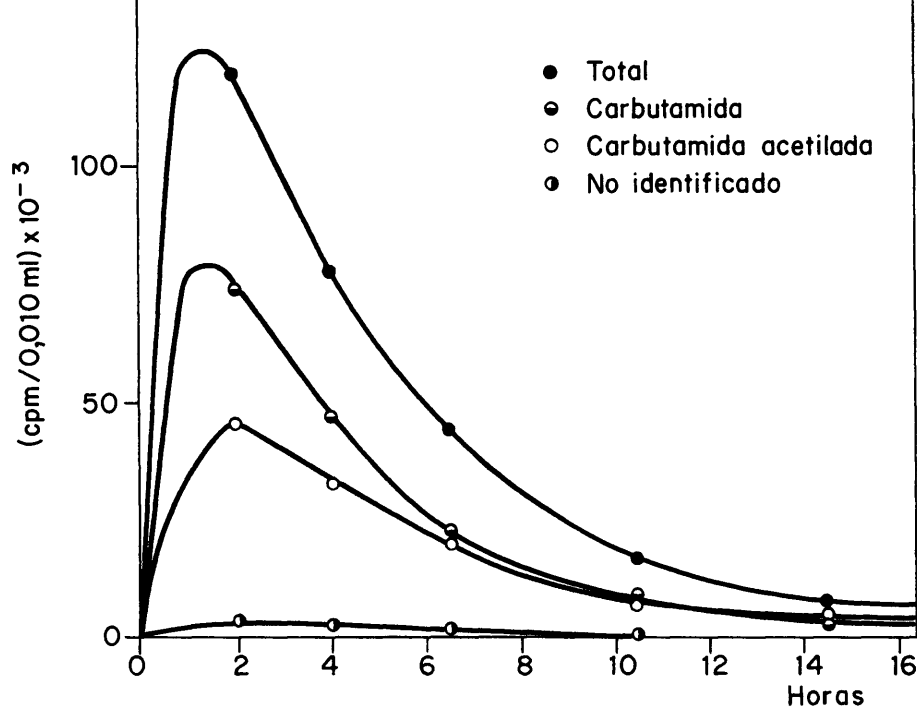


FIG. 28.—CONCENTRACION RADIATIVA DE CARBUTAMIDA- $^{35}\text{S}$ ,  $\text{N}^4$ -ACETIL-CARBUTAMIDA- $^{35}\text{S}$  Y CONCENTRACION RADIATIVA TOTAL, DESPUES DE ADMINISTRAR UNA DOSIS A DE CARBUTAMIDA MARCADA, (ORINA).

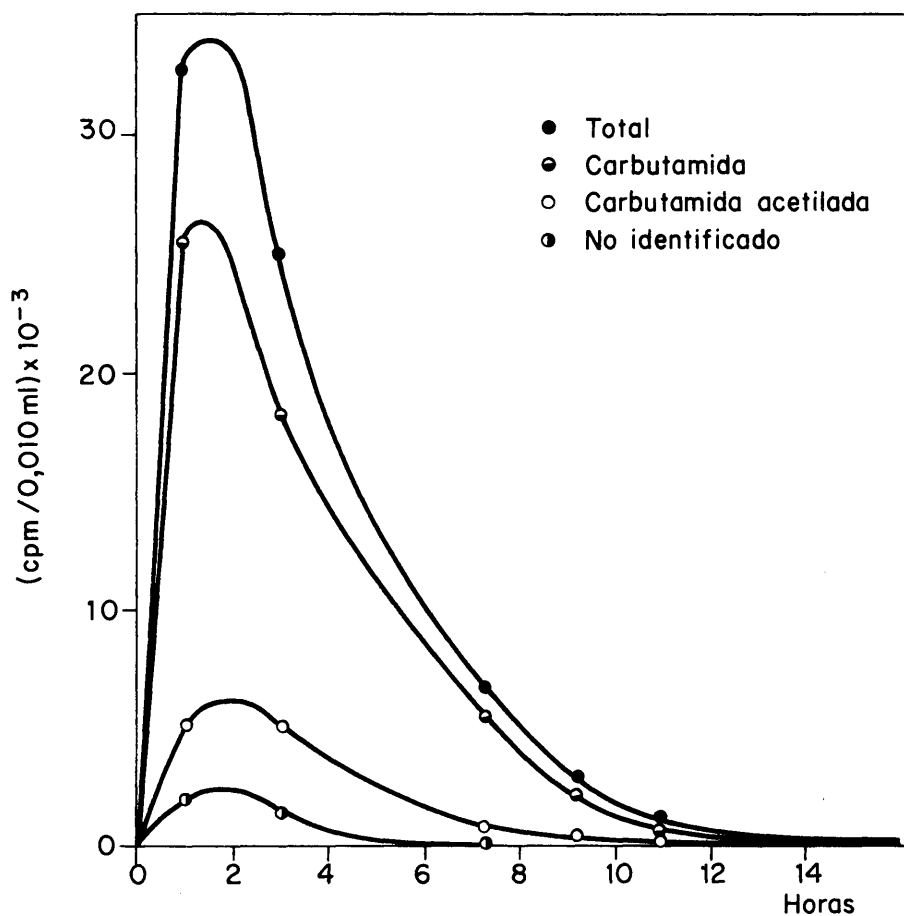


FIG. 29.—CONCENTRACION RADIATIVA DE CARBUTAMIDA- $^{35}\text{S}$ ,  $\text{N}^4$ -ACETIL-CARBUTAMIDA- $^{35}\text{S}$  Y CONCENTRACION RADIATIVA TOTAL, DESPUES DE ADMINISTRAR UNA DOSIS B DE CARBUTAMIDA MARCADA, (ORINA).

con la dosis y, para una misma dosis, con el tiempo transcurrido hasta la toma de la muestra. En la FIG. 30 se representa la concentración radiactiva en orina N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida-<sup>35</sup>S en función del tiempo, expresandola como tanto por ciento de la concentración radiactiva total y en ella se hacen patentes las diferencias apuntadas.

#### 4.2.5. Discusión de resultados.

A la vista de los datos obtenidos, relativos a la excreción de carbutamida marcada en ratas, cabe señalar en primer término que tiene lugar, casi en su totalidad por vía urinaria. Es notable el largo período de permanencia del fármaco en el organismo ya que se sigue registrando su eliminación en orina hasta después de 70 horas de una administración intravenosa de sólo 6'4 mg del compuesto. Esto hace sospechar que, junto a la recirculación enterohepática ya apuntada, exista algún mecanismo reabsorptivo que retarda la definitiva eliminación renal.

En cuanto al proceso metabólico de acetilación, las experiencias realizadas con dosis diferentes, establecen una dependencia entre el tanto por ciento de carbutamida excretada en orina en forma acetilada y la dosis de carbutamida administrada. Como puede verse en la FIG. 30, cuando se administra una dosis B (138'8 mg/Kg), la aceti-

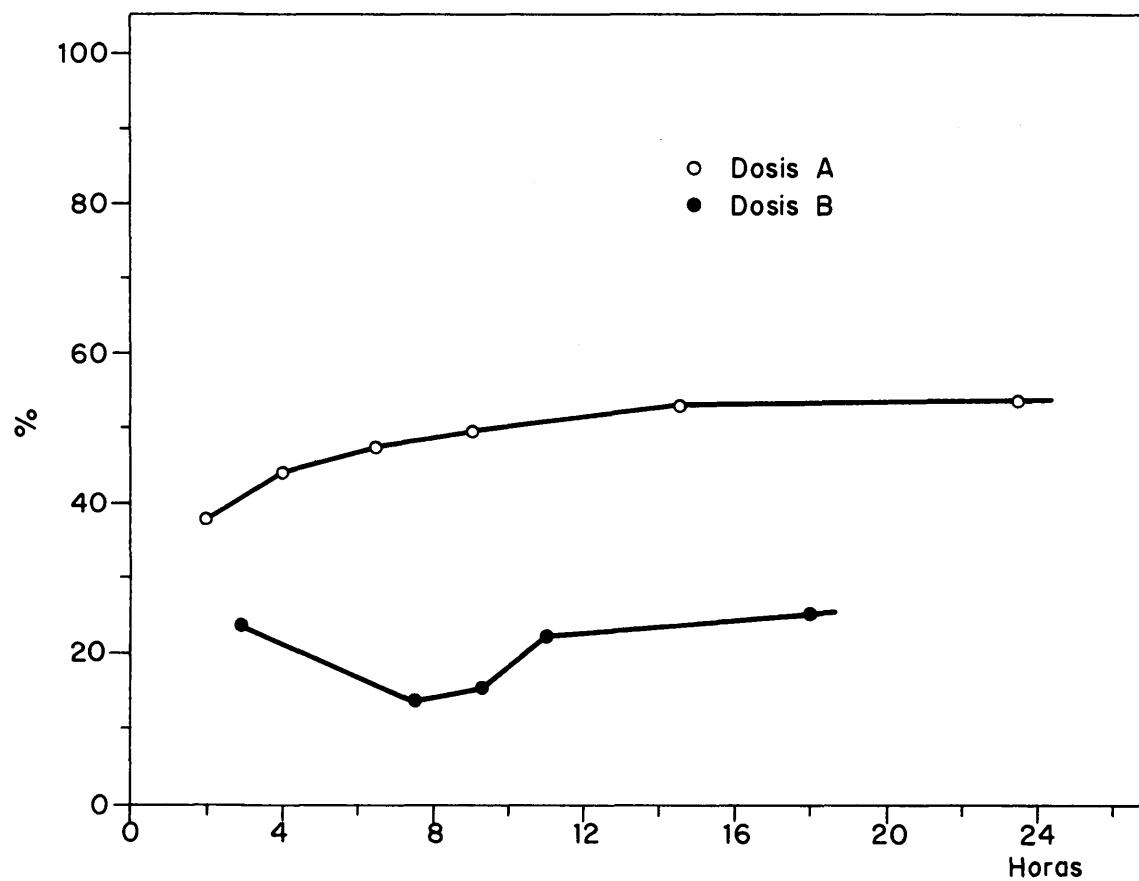


FIG. 30.—CONCENTRACION RADIATIVA DE  $N^4$ -ACETILCARBUTAMIDA- $^{35}S$  EN ORINA, EXPRESADA COMO % DE LA CONCENTRACION RADIATIVA TOTAL, EN FUNCION DEL TIEMPO.



lación es menor que con una dosis A (27'7 mg/Kg), lo cual es por otra parte lógico, tratándose de una administración intravenosa. El valor máximo encontrado del tanto por ciento de carbutamida que se excreta en orina como derivado acetilado es un 54% del total. Esto está de acuerdo con el efecto hipoglucemiante de la carbutamida en ratas, que como ya se ha dicho, depende en gran manera del grado de acetilación que sufre el compuesto, toda vez que el derivado acetilado es inactivo. El grado en que se produce la acetilación varía con la especie animal. Scholz (9) establece la siguiente gradación, en lo que respecta a magnitud del proceso de acetilación: conejo > cobaya > hombre > rata > mono > perro. Como ya se ha señalado repetidamente, en conejo, cuya capacidad de acetilación de la carbutamida es máxima, el efecto hipoglucémico es transitorio, mientras que en perro, que metaboliza carbutamida en grado mínimo, los efectos son los más acusados y prolongados. En nuestro estudio en ratas, la excreción en orina de un 54% de carbutamida acetilada, como valor máximo, demuestra una capacidad fisiológica limitada, para la acetilación del compuesto, que justifica por otra parte, su eficacia como agente hipoglucemiante en esta especie animal.

#### 4.3. MECANISMO DE ELIMINACION.

Los resultados del estudio realizado en ratas sobre excreción de carbutamida marcada y su producto de acetilación, plantean la necesidad de obtener una información más amplia sobre la farmacodinamia del compuesto y deducir la ruta fisiológica seguida por el mismo desde la administración intravenosa hasta su eliminación consiguiente, así como las consecuencias que se derivan en cuanto a su acción terapéutica. En lo que se refiere a su metabolismo, al igual que en otras arilaminas (121), el proceso de acetilación constituye una de las más importantes rutas metabólicas, actuando la acetil-coenzima-A como donador de acetato (122). Se considera que el proceso tiene lugar de forma primordial en hígado y, en este sentido, constituye un típico ejemplo de síntesis protectora con conjugación realizada por este órgano.

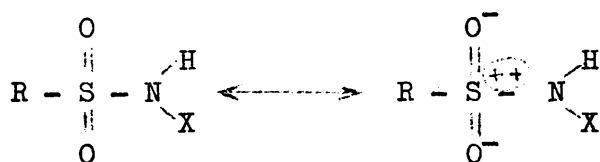
Un punto importante a esclarecer, es el lugar donde preferentemente se localiza el proceso de acetilación. Govier (123) ha demostrado que la acetilación de sulfanilamida y ácido p-aminobenzoico, atribuida al hígado, tiene lugar en las células del sistema reticuloendotelial, sin que, por el contrario, pueda demostrarse en las células del parenquima hepático. Puede pensarse en principio que la carbutamida, como derivado de sulfanilamida, sea acetilada igualmente por el sistema reticuloendotelial, que concretamente el hígado está muy desarrollado.

Daoust y Cantero (124), en un estudio comparativo de la proporción numérica de los diferentes tipos de células en hígado de rata, encuentran que el 30-35% del total son células endoteliales que limitan los conductos sinusoides. Estos datos indican que, si en estudios con homogenado de hígado se deduce una capacidad del tejido hepático para la acetilación de la carbutamida, estos resultados pueden no reflejar precisamente una función de las células del parenquima hepático.

Otro aspecto que se considera es la importancia que en el caso de la carbutamida tiene el proceso de acetilación, en relación con su mecanismo de transporte y eliminación por vía renal, que constituye, como hemos visto, la principal ruta de excreción del compuesto. Existe una abundante bibliografía referente al transporte de sulfonamidas en procesos de excreción renal, y más concretamente sobre la relación entre estructura molecular de una determinada sulfonamida y su susceptibilidad para un transporte renal activo. Como consecuencia del estudio de un gran número de sulfonamidas, Despopoulos y Callahan (21) hacen unas interesantes consideraciones teóricas en cuanto a la participación de estos compuestos en un transporte renal de tipo aniónico, basándose en la estructura del grupo funcional sulfonamido. Suponen como requisito indispensable para el transporte la existencia de una interacción fisicoquímica entre el sustrato y un receptor en la célula; sugieren que las sulfonamidas que participan en un transporte renal activo, lo hacen en su forma

aniónica y establecen que el grupo funcional  $-\text{SO}_2 - \text{N}^\ominus -$ , tiene los mínimos requerimientos estructurales para la formación de un complejo sustrato-receptor.

Basan la posibilidad de formación de este anión en la configuración electrónica del grupo  $\text{R} - \text{SO}_2 -$ , resonante entre las formas (125)



lo cual imparte un carácter parcialmente positivo al átomo de azufre, suficiente para inducir una carga positiva parcial sobre el nitrógeno amídico, que favorece su disociación como ácido.

Aquéllos sustituyentes en el anillo bencénico que tengan efecto mesómero + M (tendencia a liberar electrones) (126), determinan un desplazamiento de carga hacia el átomo de azufre que dificulta la disociación como ácido del grupo sulfonamido. Este es el caso de la carbutamida, que contiene un grupo  $-\text{NH}_2$  en posición 4. Frente a esto, la acetilación en  $\text{N}^4$  disminuye la tendencia a liberar electrones del grupo amino, debido al efecto mesómero - M del grupo  $-\text{CO}-\text{CH}_3$ , que contrarresta en parte el efecto + M del grupo  $-\text{NH}_2$  como tal. El resultado es una mayor tendencia a la formación del anión  $-\text{SO}_2 - \text{N}^-$  en el caso de la  $\text{N}^4$ -acetilcarbutamida y en consecuencia, desde el punto de

vista del transporte renal activo, cabe esperar que ésta se transporte, mientras que, por el contrario, no se transporte la carbutamida libre.

Finalmente, otro hecho a tener en cuenta en el mecanismo de eliminación de la carbutamida, del que se encuentran referencias en la bibliografía (15, 16, 28), es su excreción en bilis, seguida de una reabsorción casi completa por la circulación enterohepática. Igualmente, los resultados obtenidos en las experiencias de distribución de carbutamida marcada, comentados en 4.1.6. y la prácticamente nula excreción en heces, tal como se ha visto en 4.2.1., están en favor de esta hipótesis.

Como consecuencia de todas estas consideraciones previas, se han planteado y llevado a cabo las experiencias que a continuación se detallan, con el fin de dar un esquema completo del mecanismo de eliminación fisiológica de la carbutamida.

#### 4.3.1. Identificación y determinación de carbutamida marcada y posibles metabolitos en hígado y contenido duodenal.

Con el fin de determinar los niveles relativos de  $N^4$ -acetilcarbutamida- $^{35}S$  y carbutamida- $^{35}S$  en hígado, a las 2 y 5 horas de administrar una dosis A de carbutamida marcada, se cromatografían extractos de tejido hepático en las mismas condiciones que se han descrito para

el análisis de orina en 4.2.3.

Para la preparación de las muestras, fragmentos de hígado extraídos en el momento de sacrificar los animales, se disgregan y homogenizan en solución tampón acético-acetato sódico (0'15M, pH 6). La suspensión que resulta se filtra y extrae repetidamente con acetato de etilo y se concentran finalmente los extractos orgánicos. Muestras de esta solución se cromatografían y se determina por conteo la relación de concentraciones de  $N^4$ -acetilcarbutamida- $^{35}S$  a carbutamida- $^{35}S$ . Los resultados obtenidos son valores de este cociente que oscilan entre 0'12 y 0'15, sin que se manifiesten diferencias apreciables con el tiempo transcurrido desde la administración de carbutamida marcada.

Se ha estudiado igualmente, utilizando carbutamida marcada, la capacidad del hígado para concentrar el fármaco en bilis. Dado que la rata carece de vesícula biliar, la identificación se ha llevado a cabo en muestras del contenido duodenal de animales sacrificados a las 2 y 5 horas de administrar carbutamida marcada. Mediante extracción con acetato de etilo y concentración de los extractos, se preparan muestras de dicho contenido duodenal, que se cromatografía en las condiciones ya especificadas. El resultado del análisis es la presencia de carbutamida- $^{35}S$  en la muestra, como único producto radiactivo, tanto a las 2

como a las 5 horas.

#### 4.3.2. Microautorradiografía de hígado.

Los resultados del apartado anterior están de acuerdo con la hipótesis de que el tejido hepático es capaz de acetilar carbutamida, y que por otra parte, el compuesto se excreta en bilis.

Con el fin de conocer la distribución a nivel celular del radiofármaco, se han realizado microautorradiografías de cortes de hígado, según el procedimiento descrito en 2.3.2. Las muestras de tejidos se han tomado de animales a los que se les inyectan dosis de 50  $\mu\text{Ci}$  de carbutamida- $^{35}\text{S}$  (actividad específica 2'30  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ) y se sacrifican a las 2 y 5 horas de la administración.

El estudio de las microautorradiografías indica en todos los casos una fijación marcada de la radiactividad en las células endoteliales que bordean los espacios sinusoides y, en grado muy inferior, en el interior de las células del parenquima. Estas observaciones se ponen de manifiesto en las FIGS. 31 y 32, que corresponden a microautorradiografías de hígado, a las 2 horas de inyectar carbutamida- $^{35}\text{S}$ . En las células de parenquima, la actividad aparece más concentrada en los bordes, aparentemente dibujando los finos capilares biliares.



FIG.31. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE HIGADO (x400).



FIG.32. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE HIGADO (x 400).



Las FIGS. 33 y 34 son microautorradiografías de hígado, a las 5 horas de inyectar carbutamida marcada. La actividad concentrada en las células endoteliales sigue siendo manifiesta, mientras que ha disminuido la actividad en las células de parenquima.

#### 4.3.3. Identificación y determinación cuantitativa de carbutamida marcada y posibles metabolitos en sangre.

Se hace uso una vez más de la separación cromatográfica sobre capa fina de gel de sílice, en las condiciones descritas para el análisis de orina en 4.2.3.

La preparación de las muestras se realiza simultáneamente con las experiencias de estudio de la distribución de carbutamida marcada en órganos, con una dosis A (4.1.). De los animales sacrificados en estas experiencias a diferentes tiempos después de la administración del fármaco, se toman muestras de sangre de 1 ml, de las que se separa el plasma por centrifugación y se somete éste a extracción repetida con 4 porciones de 1 ml de acetato de etilo, que se reúnen y concentran. La eficacia del proceso extractivo se determina mediante medida de la concentración radiactiva en el plasma inicial y la concentración remanente después de la extracción con acetato de etilo, encontrándose valores del orden del 95 al 97 %.



FIG.33. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE HIGADO (x400).



FIG.34. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE HIGADO (x400).

Como resultado de la separación cromatográfica y determinación cuantitativa, se deduce el valor relativo de concentración de N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida-<sup>35</sup>S a concentración de carbutamida-<sup>35</sup>S, a diferentes tiempos después de la administración de carbutamida-<sup>35</sup>S. En la TABLA XV se reflejan estos datos y, a título comparativo, se especifican los valores que toma en orina el mismo cociente de concentraciones, determinado cuando se administra igualmente la dosis A de carbutamida marcada.

TABLA XV. Relación entre las concentraciones de N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida-<sup>35</sup>S y carbutamida-<sup>35</sup>S en sangre y orina, a distintos tiempos después de administrar una dosis A de carbutamida-<sup>35</sup>S.

Tiempo (horas)	1	2	3	4	7	10
Sangre	0'014	0'016	0'021	0'041	0'063	0'079
Orina	0'430	0'607	0'723	0'780	0'965	0'991

#### 4.3.4. Microautorradiografía de tejido renal.

Los datos reflejados en la TABLA XIV ponen claramente de manifiesto la diferencia entre los valores de con-

centración relativa de  $N^4$ -acetilcarbutamida y carbutamida que aparecen en orina y los encontrados en sangre. Esto indica que, o bien el riñón acetila carbutamida y el producto acetilado se excreta en los túbulos renales o, lo que parece más probable, hay un mecanismo diferente de transporte renal para la carbutamida libre y su producto acetilado. Con el fin de detectarse si existe en riñón una fijación intracelular importante de carbutamida, que pudiera justificar un proceso de acetilación en este tejido, se han realizado autorradiografías de tejido renal, a las 2 y 5 horas de administrar una dosis de 50  $\mu\text{Ci}$  de carbutamida- $^{35}\text{S}$  (actividad específica 2'30  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ). Las microautorradiografías correspondientes a 2 horas muestran, como puede verse en las FIGS. 36 y 37, que la radiactividad incorporada intracelularmente es escasa, si se compara con la que se concentra en los espacios peritubulares y la luz de los túbulos. Igualmente se observa la presencia de radiactividad en los espacios limitados por las dos hojas de las cápsulas de Bowman. Las FIGS. 38 y 39 muestran la distribución a las 5 horas, que no difiere esencialmente de la encontrada a las 2 horas.

#### 4.3.5. Cálculo de la depuración renal de carbutamida marcada.

De los resultados anteriores parece deducirse que



FIG. 35. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE RIÑON (x400).

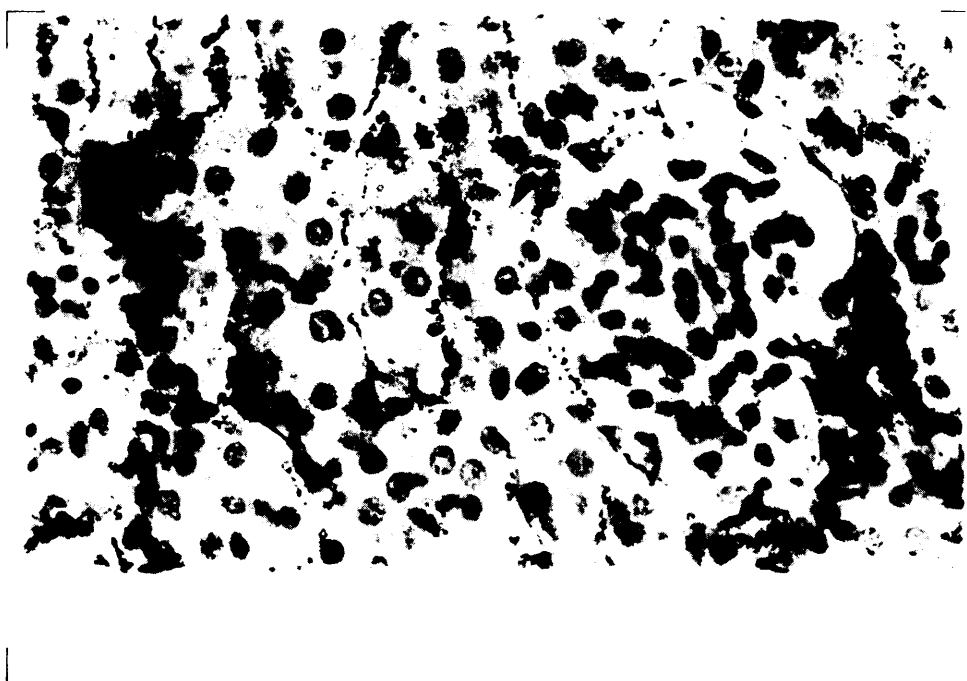


FIG. 36. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE RIÑON (x400).

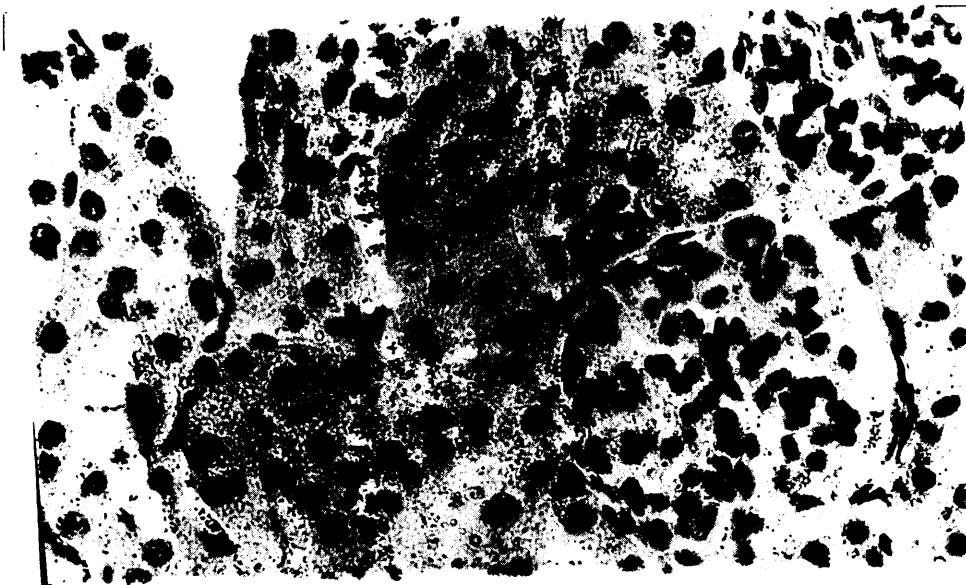


FIG. 37. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE RIÑON (x 400).



FIG. 38. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE RIÑON (x 400).

el aumento de concentración de  $N^4$ -acetilcarbutamida en orina, con respecto a la correspondiente en sangre, se debe simplemente a la existencia de un transporte activo, por parte de los túbulos, del producto acetilado, mientras que, por el contrario, no se transporta la carbutamida libre. Esta hipótesis viene además apoyada por las consideraciones teóricas que se esbozaron en 4.3. Con el fin de ponerlo de manifiesto, se han determinado los valores de depuración renal de la carbutamida marcada.

El cálculo se realiza a partir de los datos obtenidos simultáneamente con las experiencias ya descritas de identificación y determinación de metabolitos en orina y sangre. Después de administrar una dosis A de carbutamida marcada, se obtienen los siguientes valores:

Volumen de orina excretada	
a las dos horas .....	0'4 ml
Concentración radiactiva	
en orina .....	125.600 cpm/0'010 ml
Concentración radiactiva en	
sangre, determinada 1 hora	
después de la inyección .....	2.550 cpm/0'010 ml

El valor de la depuración se calcula en ml/min según la expresión:

$$D = \frac{C_o \cdot V_o}{C_s \cdot t}$$

donde  $C_o$  = Concentración radiactiva en orina

$V_o$  = Volumen de orina excretada en el tiempo  $t$ .

$C_s$  = Concentración radiactiva en sangre.

Se obtiene, sustituyendo los valores correspondientes, una depuración de la radiactividad total de 0'16 ml/min.

Este valor se ha determinado a partir de los datos de concentración radiactiva total en orina y sangre, debida a la presencia, tanto de carbutamida- $^{35}\text{S}$  como de su metabolito acetilado. Si se tienen en cuenta los valores de concentraciones relativas de  $\text{N}^4$ -acetilcarbutamida- $^{35}\text{S}$  y carbutamida- $^{35}\text{S}$  encontrados en sangre y orina (TABLA XIV), pueden calcularse los valores de depuración de los dos compuestos por separado, sin más que introducir en la expresión de  $D$ , las concentraciones radiactivas en orina y sangre debidas a cada uno de ellos. De esta forma se obtienen los siguientes resultados:

Depuración de carbutamida- $^{35}\text{S}$ : 0'09 ml/min.

Depuración de  $\text{N}^4$ -acetilcarbutamida: 3'7 ml/min



#### 4.3.6. Discusión de resultados.

Los resultados de las experiencias descritas en los apartados anteriores aclaran algunos puntos referentes a la ruta fisiológica de la carbutamida. Los análisis de extractos del contenido duodenal muestran que el compuesto se excreta en bilis, ya a las 2 horas de una administración intravenosa. El hecho de que únicamente se detecte en el tracto intestinal carbutamida libre, hace suponer que su posterior reabsorción tenga lugar igualmente como tal carbutamida, lo cual es uno de los factores que determinan la larga vida biológica del compuesto.

Referente al proceso de acetilación, los análisis de extractos de homogenados de hígado muestran la presencia de cantidades relativamente altas de  $N^4$ -acetilcarbutamida que no dejan lugar a duda respecto a la participación del hígado en el proceso de conjugación con acetato. En cuanto a la localización histológica de dicho proceso, a tenor de las premisas establecidas en 4.3., el resultado de las microautorradiografías induce a pensar que sean las células endoteliales de los conductos sinusoides las responsables de la acetilación de carbutamida, según se desprende de la fijación preferente de radiactividad que muestran cuando se inyecta carbutamida marcada. Consecuentemente, las células endoteliales devuelven carbutamida acetilada a la circulación sanguínea

en los propios espacios sinusoides hepáticos, que será eliminada finalmente en orina, donde aparece ya a la media hora de inyectar carbutamida. Por su parte, las células del parenquima hepático retienen carbutamida y la excretan en bilis sin metabolizarla, lo cual explica la ausencia de carbutamida acotilada en el tracto duodenal.

En cuanto al proceso eliminatorio en riñón, tanto el estudio microautorradiográfico del tejido, como los cálculos de depuración renal, confirman las hipótesis establecidas en 4.3. En efecto, los parámetros normales de función renal en rata son los siguientes (127) :

Flujo plasmático renal, determinado mediante

ácido p-aminohipúrico o diodrast: 4'4 ml/min.

Índice de filtración glomerular, determinado mediante

inulina, manitol o creatinina: 1'7 ml/min.

Fracción de filtración: 28%.

Si se comparan con estos, los valores de depuración calculados en 4.3.5., es decir:

depuración de carbutamida: 0'09 ml/min.

depuración de N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida: 3'7 ml/min.

se deduce que la carbutamida libre, con un valor de la depuración muy por debajo del índice de filtración glomerular, debe sufrir un proceso importante de reabsorción tubular,

que puede estimarse en un 95%. Por su parte, el valor de la depuración obtenido para la N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida, muy próximo al del flujo plasmático renal, indica que es depurada casi completamente de la sangre a su paso por el riñón, y por lo tanto se transporta activamente en los túbulos.

Conviene advertir que en el cálculo de los valores de depuración no se ha tenido en cuenta la unión de carbutamida a proteínas plasmáticas. Este factor, que puede ser muy significativo en el cálculo de valores de depuración (21), no tiene especial trascendencia en el caso de carbutamida, ya que el porcentaje que se une a proteínas no es superior al 20-25%, según hemos determinado. Si se efectúa la corrección correspondiente, pueden alterarse ligeramente los valores absolutos obtenidos de la depuración de carbutamida y su metabolito, pero no se altera su significación comparativa frente a los parámetros normales de función renal, ni tampoco las conclusiones deducidas.

#### 4.4. MECANISMO DE ACCION HIPOGLUCEMIANTE. RESULTADOS.

De acuerdo con el plan de trabajo establecido, se ha realizado un estudio autorradiográfico de los tejidos pancreáticos y muscular estriado de ratas tratadas con carbutamida marcada. Los datos obtenidos permiten discutir el mecanismo de acción de este compuesto, sobre la base de las dos hipótesis sostenidas como fundamentales: la de estimulación de la secreción insulínica por una parte y la de potenciación de la insulina en tejidos periféricos, por otra. En la discusión realizada en 4.1.6. sobre los resultados obtenidos en el estudio de la distribución de niveles de actividad en diferentes órganos, subsiguiente a la administración de carbutamida marcada (4.1.), se destacan los valores relativamente bajos de actividad concentrada en tejido pancreático (FIGS. 17 y 20). Por el contrario, puede observarse en las mismas figuras, los niveles altos y persistentes que se alcanzan en músculo cardíaco e igualmente, en músculo esquelético (FIG. 20), la radiactividad concentrada es al menos del mismo orden que la que se detecta en páncreas. Finalmente, aunque con resultados poco reproducibles, se ha registrado en general una concentración radiactiva importante en cápsulas suprarrenales. En consecuencia se han sometido páncreas, cápsulas suprarrenales y músculo cardíaco, al procedimiento autorradiográfico descrito en 2.3.2., obteniéndose los resultados que se detallan seguidamente.

#### 4.4.1. Microautorradiografía de páncreas.

Ratas a las que se administran 50  $\mu$ Ci de carbutamida-<sup>35</sup>S (actividad específica 2'30  $\mu$ Ci/mg) se sacrifican en dos lotes, después de 1 y 3 horas. Se aísla el páncreas y se somete al procedimiento autorradiográfico descrito. Los resultados del mismo, correspondientes al tejido de un animal sacrificado después de 1 hora, pueden observarse en la FIG. 39. En contra de lo que podría esperarse, la fijación intracelular de radiactividad, a nivel de los islotes de Langerhans, es realmente escasa y desde luego inferior a la que se observa en el tejido acinar exocrino. Las FIGS. 40 y 41, corresponden al mismo tipo de experiencia, con un animal sacrificado a las 3 horas de la inyección. La primera de ellas presenta un islote de Langerhans, en el que se apreciaba una fijación de radiactividad prácticamente nula. Por el contrario, en la FIG. 41 puede verse una marcada localización de radiactividad bordeando los acinos.

#### 4.4.2. Microautorradiografía de cápsulas suprarrenales.

En las mismas experiencias descritas en el apartado anterior, se aíslan ambas cápsulas suprarrenales y se someten a idéntico procedimiento autorradiográfico. Las FIGS. 42 y 43 muestran sendos cortes de cápsula suprarrenal, correspondientes a un animal sacrificado a las 3 horas de la



FIG. 39 - MICROAUTORRADIOGRAFIA DE PANCREAS (x 160)



FIG. 40 - MICROAUTORRADIOGRAFIA DE PANCREAS (x 400)



FIG. 41.- MICROAUTORRADIOGRAFIA DE PANCREAS (x 400)

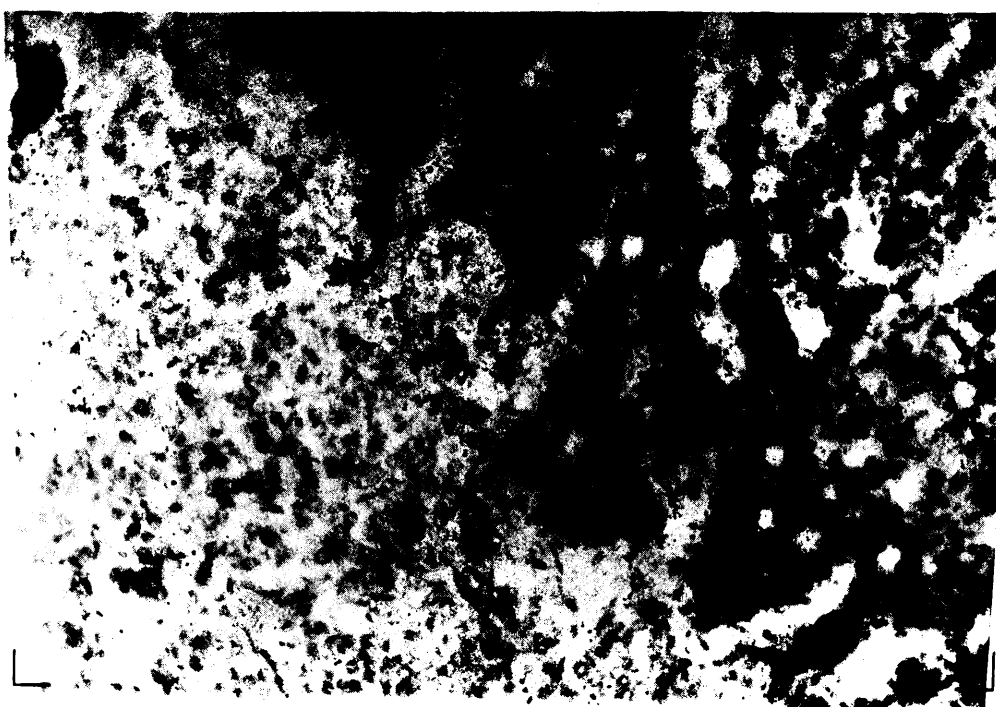


FIG. 42.- MICROAUTORRADIOGRAFIA DE CAPSULA SUPRARRENAL (x 160)

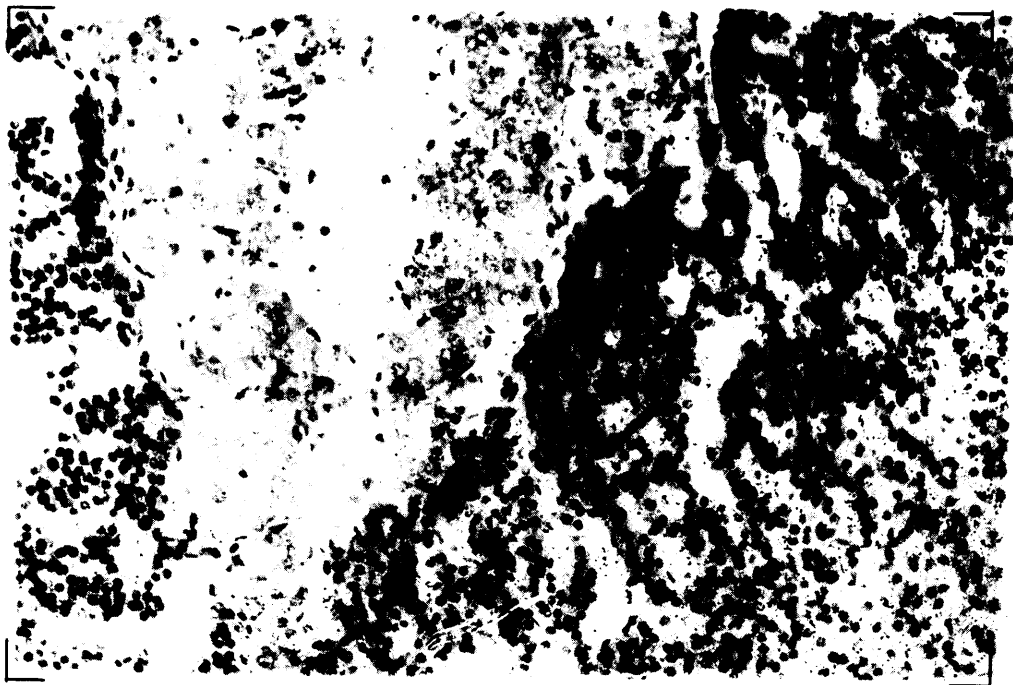


FIG. 43.—MICROAUTORRADIOGRAFIA DE CAPSULA SUPRARRENAL (x160)

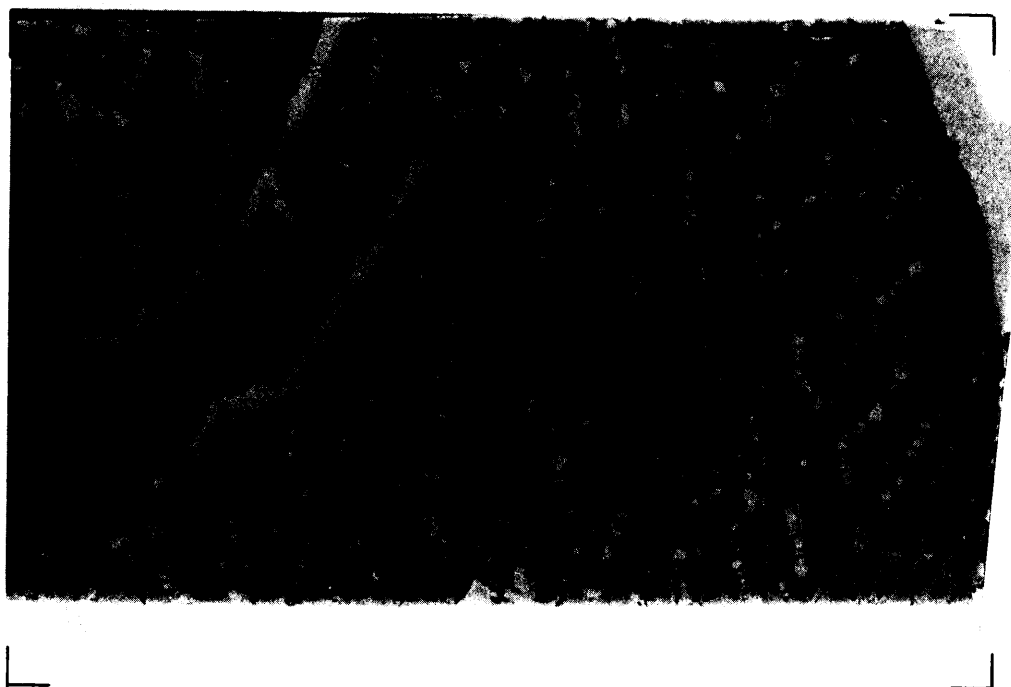


FIG. 44.—MICROAUTORRADIOGRAFIA DE MUSCULO CARDIACO (x160)



inyección. La fijación de radiactividad no es muy precisa y sólo se puede deducir que es relativamente importante en la zona reticular de la corteza y prácticamente nula en la médula. No está clara una distribución intracelular del fármaco, por lo que las actividades relativamente altas encontradas en las experiencias de distribución, cabe atribuir las a la rica irrigación sanguínea de este tejido.

#### 4.4.3. Microautorradiografía de músculo cardíaco.

Al igual que en los casos anteriores, se han preparado microautorradiografías de tejido cardíaco procedente de ratas sacrificadas a las 1, 3 y 5 horas de administrar 50  $\mu\text{Ci}$  de carbutamida- $^{35}\text{S}$ . En la FIG. 44 se representa, a poco aumento, un corte trasversal del tejido extraído después de 1 hora de administrar el radiofármaco y en las FIGS. 45 y 46 se recogen, a mayor aumento, cortes longitudinales de las fibras musculares de tejido cardíaco extraído a las 3 horas. Igualmente, las FIGS. 47 y 48 corresponden a tejido extraído a las 5 horas, Cualitativamente se observa de forma general, una escasa fijación intracelular de radiactividad, mientras que por el contrario, hay una marcada fijación a nivel de la membrana. Las diferencias cuantitativas entre tejidos extraídos a diferentes tiempos después de la administración del radiofármaco, son poco acusadas, lo cual da ~~idea~~ idea de una fijación persistente y prolongada a la estructura tisular.



FIG. 45. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE MUSCULO CARDIACO (x 400).



FIG. 46. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE MUSCULO CARDIACO (x 400).



FIG. 47. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE MUSCULO CARDIACO (x 400).



FIG. 48. — MICROAUTORRADIOGRAFIA DE MUSCULO CARDIACO (x 400).

#### 4.4.4. Discusión de resultados.

Si se consideran los resultados del estudio micro-autorradiográfico, en relación con los posibles mecanismos de acción hipoglucemiante de la carbutamida, expuestos en la introducción, es evidente que suponen un dato importante en contra de la hipótesis que atribuye a este compuesto una acción betacitotropa. La fijación prácticamente nula de radiactividad en los islotes de Langerhans después de administrar carbutamida- $^{35}\text{S}$ , demuestra que no existe afinidad específica de la carbutamida por las células insulinosecretoras, al menos en el sentido de una fijación en dichas células del tipo de la demostrada para la aloxana-2- $^{14}\text{C}$  por Hammarström y Ullberg (128) utilizando igualmente la técnica autorradiográfica. Estos resultados obtenidos en rata, están en cierto modo de acuerdo con los obtenidos recientemente por Lacy y cols. (62), según los cuales, la tolbutamida, "in vitro", no es capaz de estimular la secreción de insulina en islotes de Langerhans aislados de rata. Debe tenerse en cuenta no obstante que, a tenor de la complejidad del mecanismo de estimulación de la secreción insulínica, comentado anteriormente (1.3.1.2.), una carencia de afinidad selectiva de las sulfonilureas por las células beta pancreáticas, no se opone a una acción insulino-secretora de estas sustancias, a través de un mecanismo indirecto. Sobre este punto insistiremos posteriormente.

En cuanto a los resultados obtenidos en la autorradiografía de músculo cardíaco, confirman plenamente la hipótesis de una acción periférica de la carbutamida y en particular, la selectividad de fijación demostrada a nivel de la membrana celular, sitúa estos resultados en la línea de los obtenidos recientemente por Feldman y Lebovitz (98) con tolbutamida, según los cuales (1.3.3.) "la potenciación de la acción de la insulina en el sistema de transporte de azúcares en el músculo esquelético, puede ser uno de los más importantes efectos de la terapia con este fármaco".

El mecanismo por el cual se produce esta potenciación en el transporte de glucosa en el músculo, parece difícil de precisar, pero los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que dicho mecanismo requiere la presencia de carbutamida a nivel de la propia membrana celular en el músculo estriado, a juzgar por la importante concentración del fármaco a este nivel. Consideramos a continuación brevemente los aspectos mas significativos del transporte de glucosa a través de la membrana celular (fundamentalmente en músculo estriado) y la influencia de la insulina sobre dicho transporte, para discutir finalmente el mecanismo de acción de la carbutamida sobre dicho proceso, a la luz de los resultados experimentales que acabamos de exponer.

#### 4.4.4.1. Transporte de glucosa en la membrana celular.

##### Influencia de la insulina.

La incorporación de glucosa a la célula muscular estriada, así como a varios otros tipos de células, se considera un proceso de tres etapas: a), paso de la glucosa desde el capilar a la membrana celular; b), transporte de la glucosa a través de la membrana y c), fosforilación intracelular de la glucosa por el sistema quinásico correspondiente. Como es sabido desde antiguo, el transporte a través de la membrana celular tiene importancia fundamental como limitante de la velocidad de incorporación de la glucosa y es además uno de los puntos de acción de la insulina.

Se ha estudiado el transporte en experiencias "in vivo" en animales nefrectomizados así como en diversas preparaciones "in vitro", tales como corazón de rata aislado y perfundido, diafragma de rata aislado y sartorio de rana aislado. Asimismo se ha estudiado ampliamente el transporte "in vitro" en tejido adiposo y en eritrocitos e incluso, recientemente, a nivel subcelular, en la fracción microsomal de células de tejido adiposo (129).

Dado que la glucosa se fosforila con gran rapidez en cualquiera de estos sistemas, una vez que penetra la membrana, en estudios de transporte se mide

generalmente la incorporación de varios monosacáridos que no se metabolizan y participan sin embargo del sistema de transporte a través de la membrana, tales como 3-O-metil-D-glucosa, L-arabinosa, D-xilosa y D-galactosa. Lo que se diga para la glucosa es válido, al menos cualitativamente, para estos monosacáridos.

Concretándonos aquí fundamentalmente al tejido muscular estriado, el proceso de transporte exhibe, como es sabido, las siguientes propiedades:

- a) Estereoespecificidad por el sustrato (130, 131, 132), ya que además de la glucosa, el mismo sistema es capaz de transportar, con velocidades variables, otros azúcares tales como los arriba mencionados, pero, por el contrario, no se transportan L-glucosa, sorbitol, manitol o inositol.
- b) Cinética de saturación del tipo Michaelis-Menten, (132, 133), que sugiere que el componente de la membrana implicado en el proceso de transporte se encuentra en cantidad limitada.
- c) Competición entre pares de azúcares (130, 131), que implica algún tipo de interacción química reversible con el componente transportador, que, para un determinado azúcar,

puede quedar reducida en presencia de un segundo azúcar.

Estas tres propiedades del transporte presuponen la combinación transitoria del azúcar con un componente estereoespecífico de la membrana. Una cuarta propiedad confiere además a dicho componente el carácter de portador móvil. Esta propiedad es la de transporte de un determinado azúcar hacia el exterior de la célula, en contra de su propio gradiente de concentración, inducido por otro azúcar que compite por el sistema transportador y tiene mayor afinidad por el mismo (134). La xilosa, por ejemplo, se transporta hacia el exterior contra gradiente, en presencia de glucosa, que por metabolizarse más rápidamente, ofrece un alto grado de competición por el transporte hacia el interior de la célula (134, 135).

El transporte, tanto de glucosa como de azúcares no metabolizables, se acelera notablemente en ambas direcciones (135) por acción de la insulina, hasta el punto de que, a concentraciones extracelulares de glucosa relativamente altas, y en presencia de insulina, la fosforilación resulta ser limitante de la velocidad de incorporación de glucosa (132). Debe tenerse en cuenta por otra parte, que en presencia de insulina, no se transporta tampoco L-glucosa, lo cual indica que la acción de la hormona se produce sobre el sis-



tema transportador y no abre en la membrana rutas inespecíficas de penetración. Tampoco parece que la insulina influya significativamente sobre el proceso de fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato.

Igualmente, el transporte se acelera por condiciones anaerobias y por toda una serie de agentes que inhiben la fosforilación oxidativa, tales como 2,4-dinitrofenol, arsenito, arsenato y cianuro. Por el contrario, se inhibe competitivamente por la floridzina y la floretina (137), varios difenoles con actividad estrogénica (138) y por la fenolftaleína (139). Asimismo son inhibidores reversibles no competitivos, entre otros, diferentes compuestos mercuriales tales como p-cloromercuribenzoatos y el propio  $Hg^{++}$  o inhibidores no competitivos irreversibles, el 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno y la N-etilmaleimida (140).

La forma de participación de la insulina en el mecanismo de transporte de la glucosa, no está suficientemente determinada. Por una parte, la interacción de la hormona con la célula muscular se ha estudiado en el sentido de demostrar si la insulina debe o no ligarse a la membrana celular, como requerimiento previo para ejercer su función sobre el transporte. Tras conclusiones contradictorias, el criterio expuesto recientemente

por Narahara y colabs. (142), sugiere la existencia de dos tipos de asociación de la insulina al músculo: una parte o componente de la unión, que denominan "específica", se satura a concentraciones de insulina que producen un máximo efecto en la permeabilidad y puede relacionarse directamente con la acción biológica de la hormona, mientras que otra componente de la asociación insulina-músculo, denominada "no específica", se incrementa con la concentración de insulina hasta niveles que exceden el de actuación fisiológica. Este tipo de interacción implica que no haya correlación entre la cantidad de insulina asociada al tejido y el efecto biológico medido sobre el transporte (143, 144). En cualquier caso, cabe pensar que, de acuerdo con la teoría del segundo mensajero (145), la interacción específica de la insulina con la membrana celular no sea más que el primer paso de la transmisión del mensaje hormonal, que dé lugar a una serie de sucesos que finalmente se traduzcan en un incremento del transporte.

La influencia de un tratamiento con enzimas proteolíticas en el proceso de transporte, lleva a postular la unión de la insulina a un sistema efector de naturaleza proteica, presente en la membrana, diferente del sistema transportador de azúcares y que sea este sistema efector el que inicie los sucesos que conducen a una aceleración en el transporte. Esta hipótesis

por Narahara y colabs. (142), sugiere la existencia de dos tipos de asociación de la insulina al músculo: una parte o componente de la unión, que denominan "específica", se satura a concentraciones de insulina que producen un máximo efecto en la permeabilidad y puede relacionarse directamente con la acción biológica de la hormona, mientras que otra componente de la asociación insulina-músculo, denominada "no específica", se incrementa con la concentración de insulina hasta niveles que exceden el de actuación fisiológica. Este tipo de interacción implica que no haya correlación entre la cantidad de insulina asociada al tejido y el efecto biológico medido sobre el transporte (143, 144). En cualquier caso, cabe pensar que, de acuerdo con la teoría del segundo mensajero (145), la interacción específica de la insulina con la membrana celular no sea más que el primer paso de la transmisión del mensaje hormonal, que dé lugar a una serie de sucesos que finalmente se traduzcan en un incremento del transporte.

La influencia de un tratamiento con enzimas proteolíticas en el proceso de transporte, lleva a postular la unión de la insulina a un sistema efector de naturaleza proteica, presente en la membrana, diferente del sistema transportador de azúcares y que sea este sistema efector el que inicie los sucesos que conducen a una aceleración en el transporte. Esta hipótesis

está basada en el hecho demostrado por Kono (146, 147) en tejido adiposo, según el cual, en células tratadas con tripsina, quimotripsina, papaína o ficina, la insulina no es capaz de estimular la incorporación de glucosa. Sin embargo, estas mismas células conservan intacto el sistema estereoespecífico de transporte de azúcares, responden normalmente a una mayor concentración de glucosa en el medio y no se ha alterado en ellas la capacidad lipolítica en términos de elevación de los niveles de AMP cíclico en respuesta a epinefrina o ACTH. Sin embargo, al igual que con el transporte de glucosa no hay respuesta de la actividad lipolítica a la insulina.

Estos resultados sugieren la existencia de un efector de la insulina, necesario para la transmisión de la señal de la hormona sobre los sistemas de transporte y lipolítico. Este sistema efector debe incluir en la opinión de Kono, tanto el lugar al que la insulina se fija en la membrana celular, como la serie de elementos que posteriormente transmiten las señales apropiadas al sistema de transporte de glucosa y a la adenil-ciclasa. De acuerdo con esto, puesto que este sistema efector es sensible a la tripsina y otras enzimas proteolíticas, se deduce que el componente modificado es de naturaleza proteica. Esta conclusión está corroborada por el hecho de que las células tratadas

e inactivadas para la insulina recuperan la mayor parte de su actividad después de inactivar la enzima proteolítica e incubar de nuevo. Esta recuperación de actividad se inhibe por puromicina y cicloheximida (147), a concentraciones de estos agentes, capaces de inhibir la biosíntesis de proteínas en células de tejido adiposo.

Otro aspecto a considerar en la interacción de la insulina con la membrana, es el requerimiento de la presencia continuada de moléculas de insulina a este nivel, como requisito para que ejerza estimulación de la permeabilidad a la glucosa (136). En efecto, tanto en tejido adiposo como en músculo estriado, la acción de la insulina sobre el transporte, resulta anulada en preparaciones "in vitro" cuando se lava la preparación con buffer desprovisto de insulina o bien cuando se añade al medio suero anti-insulina.

#### 4.4.4.2. Influencia de la carbutamida en la incorporación de la glucosa al músculo estriado.

Si los resultados obtenidos recientemente por Feldman y Lebovitz (98) con tolbutamida, pueden hacerse extensibles a la carbutamida, es evidente que estas sulfonilureas hipoglucemiantes no ejercen por si mismas y en ausencia de la insulina, influencia alguna sobre la incorporación de glucosa en músculo estriado, pero

no obstante, queda constancia de su capacidad para acelerar el transporte de glucosa a través de la membrana, mediado por la insulina. La localización específica de carbutamida-<sup>35</sup>S a nivel de la membrana, puesta de manifiesto en el presente trabajo, no puede interpretarse por lo tanto como consecuencia de una acción de este fármaco sobre el sistema transportador de azúcares en la membrana, sino por el contrario, la acción se debe localizar en el sistema efector de la insulina propuesto por Kono o sobre la propia insulina a este nivel. A falta de un conocimiento previo sobre la naturaleza del sistema efector postulado y de los sucesos que pueden mediar entre la primera señal de la insulina y la activación del transporte en la membrana, no es posible especular sobre la acción de las sulfonilureas sobre el mismo.

Por el contrario, la posibilidad de que las sulfonilureas puedan influir sobre la propia insulina a nivel de la membrana celular, es una interpretación que parece más satisfactoria. Como ya se dijo al final del apartado anterior (4.4.4.1.), en experiencias "in vitro", la presencia continuada de insulina en la membrana, es requisito indispensable para la acción de la hormona sobre la permeabilidad a la glucosa. De acuerdo con esto, la acción de las sulfonilureas se debe materializar en una potenciación o prolongación de la

actividad insulínica a nivel de la propia membrana.

En los últimos años se viene prestando especial atención a los diferentes mecanismos de regulación extrapancreática de la actividad fisiológica de la insulina, en relación con tres conceptos fundamentales: procesos de inactivación o degradación de la hormona, diferentes formas de insulina circulante y antagonistas de la acción insulínica según diferentes vías. Una interesante revisión de estos aspectos ha sido realizada por Katzen y Glitzer (148).

En lo que respecta a las sulfonilureas, tiene especial interés, a juzgar por los hechos experimentales, la posible existencia de un mecanismo de regulación a través de diferentes formas de insulina en la circulación periférica. Este concepto, defendido fundamentalmente por Antoniades y cols. (149, 150, 151, 152), está respaldado por una extensa base experimental que diferencia dos tipos interconvertibles de actividad insulínica circulante: una insulina "libre" y, en equilibrio con ella, una insulina "combinada" en forma de complejo con una proteína básica. La forma "libre" es activa cuando se ensaya la actividad insulínica tanto sobre diafragma de rata como sobre tejido adiposo, mientras que la forma "combinada" es sólo efectiva sobre tejido adiposo. Ambas formas han sido separadas

y caracterizadas fisicoquímicamente (150, 151) y no parecen diferenciarse sustancialmente, salvo en la forma de aislamiento, de las formas igualmente descritas por Saamaan y colabs. (153, 154), que se refieren a una forma "típica" de insulina, que es completamente inhibida por suero anti-insulina, para diferenciarla de una forma "atípica" de la hormona, que es inhibida sólo de manera incompleta por dicho suero. Análoga significación parecen tener las formas de insulina "supresible" y "no supresible" (NSILA), descritas por otros grupos (155, 156).

En un trabajo reciente, Oelz y colabs. (157) han estudiado la naturaleza de la actividad insulínica "no supresible" (NSILA) en plasma humano, separando incluso dos componentes de la misma. Uno de ellos, insoluble en etanol acidulado y que denominan NSILA-P, tiene un peso molecular de  $10^5$  a  $1.5 \cdot 10^5$  y representa el 90-95 % de la NSILA, mientras que un segundo componente, soluble en etanol acidulado y que denominan NSILA-S, tiene un peso molecular de 6.000 a 10.000. Este segundo componente posee, a igualdad de concentración, una actividad más acusada y prolongada que la insulina exógena cristalizada, sobre el nivel de glucemia y sobre los niveles de ácidos grasos libres en plasma. Estimula asimismo el consumo de glucosa en el músculo de animales diabéticos o normales por un período de tiempo mayor que



la insulina y tiene el mismo efecto sobre el tejido adiposo.

En cuanto a la significación de estas dos formas de insulina desde el punto de vista de la actividad fisiológica de la hormona, la hipótesis defendida por Antoniades (158), aunque discutida por otros autores (159), consiste en que dicha actividad se controla a través de un equilibrio entre las formas "activa" o "libre" e "inactiva" o "combinada" de la hormona, de forma que la glucosa induce la conversión de insulina "combinada" en insulina "libre", sugiriendo asimismo, que una malfunción del mecanismo que regula este equilibrio entre ambas formas de insulina sea una de las causas que motiva el estado diabético en adultos. Incluso, el hecho de que la insulina "combinada", inefectiva en músculo "in vitro", sea efectiva en tejido adiposo, explica según Antoniades la tendencia a la adiposidad de este tipo de diabéticos. Sin embargo, para los detractores de este tipo de mecanismo de regulación, no está clara la necesidad de este sistema, que parece obviar el requerimiento de una regulación de la insulina circulante mediante un control directo de la secreción pancreática de la hormona (160).

En relación con la participación de las sulfonamidas hipoglucemiantes en este equilibrio de regulación,

el mismo Antoniades (161) ha descrito un incremento de la insulina "libre" en la circulación periférica después del tratamiento con tolbutamida, tanto en diabéticos como no-diabéticos y observaciones en el mismo sentido han sido verificadas por otros (162, 163). Resultados análogos han sido descritos por Dobrzauski (164) para la carbutamida. A la vista de estos antecedentes, la localización específica de la carbutamida-<sup>35</sup>S a nivel de la membrana celular en tejido muscular estriado, sólo puede interpretarse como una acción "in situ" de este compuesto sobre la disociación de insulina "combinada", liberando insulina "libre" y potenciando de esta forma la acción de la hormona sobre el transporte de glucosa. Si bien el mecanismo de regulación propuesto por Antoniades puede ser discutible, es evidente que una influencia de las sulfonilureas sobre el equilibrio insulina "libre" - insulina "combinada" explica satisfactoriamente los diversos modos de acción atribuidos a estos compuestos. Por una parte, la alteración periférica de este equilibrio puede indirectamente estimular la secreción insulínica a nivel pancreático e incluso, como sugieren Bhide y Aiman (165), participar en la disociación de los complejos insulina-proteína presentes en forma soluble y fácilmente asequible en las células beta, aunque esta posibilidad parece más improbable a juzgar por la falta de fijación de carbutamida-<sup>35</sup>S a este nivel.

Por otra parte, si tal como ~~Antoniades~~ y colaboradores proponen, la insulina se segrega en el páncreas en forma "libre" y se transforma en "combinada" en el hígado, la influencia de las sulfonilureas a nivel hepático, favoreciendo la presencia de la forma "libre" de la hormona, explica los resultados experimentales que indican una acción hepática de estos compuestos y que, tal como se ha dicho, pueden explicarse siempre como consecuencia de un incremento de la actividad insulínica en este órgano.

## 5. CONCLUSIONES.

## 5. CONCLUSIONES.

De las discusiones de resultados expuestas en diferentes apartados a lo largo del trabajo, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- 1) Según el procedimiento descrito en la presente memoria, puede sintetizarse carbutamida-<sup>35</sup>S en condiciones de actividad específica y pureza química y radioquímica satisfactorias.
- 2) En la ~~parte~~ experimental previa, se describe un método de corrección de los errores por autoextinción debida al color de las muestras, en la medida por centelleo líquido de materiales de origen biológico, en función de la densidad óptica de dichas muestras a 425 nm.
- 3) En cuanto a la farmacología de la carbutamida en ratas, los puntos más importantes a destacar, son los siguientes:
  - a) La distribución de carbutamida en ratas muestra una concentración alta y persistente en hígado y riñón, órganos implicados en la excreción del fármaco. Concentraciones importantes se fijan en músculo estriado, singularmente en corazón. Por el contrario, los nive-

les en tejido pancreático son comparativamente muy bajos.

- b) De la variación de la distribución en el tiempo, se deduce una lenta eliminación de la carbutamida, en la que está implicada una circulación enterohepática del fármaco, con reabsorción casi completa del mismo. En consecuencia la eliminación tiene lugar fundamentalmente por vía urinaria.
- c) La localización selectiva de carbutamida marcada a nivel de las células endoteliales de los conductos sinusoides hepáticos, determinada por microautorradiografía de carbutamida-<sup>35</sup>S, se interpreta como una participación del sistema reticuloendotelial en el proceso metabólico de acetilación de la carbutamida a N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida.
- d) En un 54% como máximo, la carbutamida se excreta en orina en forma acetilada. De la comparación entre los niveles de carbutamida y N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida en orina y sangre, así como del estudio microautorradiográfico del tejido renal y el cálculo de la depuración renal del fármaco y su metabolito, se deduce

que éste último se transporta activamente en los túbulos renales, mientras que la carbutamida libre se reabsorbe en un 95%, lo cual justifica, junto a la recirculación enterohepática mencionada, la larga vida media biológica de este compuesto.

- 4) Referente al mecanismo de acción hipoglucemiante de la carbutamida, el estudio microautorradiográfico de los tejidos pancreático y muscular estriado, concretamente tejido cardíaco, demuestra que después de una administración simple de carbutamida-<sup>35</sup>S, no se produce fijación apreciable de radiactividad en los islotes de Langerhans, mientras que por el contrario, la fijación es muy importante a nivel de la membrana celular en el músculo. En consecuencia, se concluye que el mecanismo de acción fundamental de la carbutamida, no es la estimulación directa de la secreción pancreática, sino la potenciación de la hormona en su acción sobre el transporte de glucosa a nivel de la membrana celular. En cuanto a la naturaleza de esta potenciación se interpreta como una influencia en la disociación de los complejos insulina-proteína presentes en la circulación periférica, aumentando la disponibilidad de in-

ulina "libre" o "típica" a nivel de la membrana celular en el músculo estriado. Este mecanismo de acción de la carbutamida no excluye una acción de tipo indirecto sobre las células beta insulinosecretoras, fundamentalmente, como consecuencia de un tratamiento agudo o crónico con este fármaco.



## 6. BIBLIOGRAFIA.

6. BIBLIOGRAFIA.

1. KOLB, K. H., J. Nucl. Biol. Med. 12, 42 (1968).
2. JANBON, M., CHAPTAL, J., VENDEL, A., SCHAAP, J. D.,  
Montpell. med. 21-22, 441 (1942).
3. BERTRAM, F., BENDFERDT, E., OTTO, H., Dt. med. Wschr.,  
80, 1455 (1955).
4. ACHELIS, J. D., HARDEBECK, K., Dt. med. Wschr. 80,  
1452 (1955).
5. FRANKE, H., FUCHS, J., Dt. med. Wschr. 80, 1449 (1955).
6. BANDER, A., CREUTZFELDT, W., DORFMULLER, H., ERHARDT, H.,  
MARX, R., MASKE, H., MEIER, W., MOHNIKE, G., PFEIFFER, E.  
F., SCHLAGINTWWEIT, S., SCHOFFLING, K., SCHOLZ, J.,  
SEIDLER, I., STEIGERWALD, H., STICH, W., STOTTER, G.,  
ULRICH, H., Dt. med. Wschr. 81, 823 (1956).
7. BANDER, A., en "Oral hypoglycaemic agents", (Campbell, G.  
D., Ed.), Academic Press, p. 23, London-New York (1969).
8. LOUBATIERES, A., en "Oral hypoglycaemic agents", (Camp-  
bell, G. D., Ed.), Academic Press, p. 1, London-New-York  
(1969).

9. ROOT, M. A., J. Pharmacol. Exptl. Therap. 119, 468 (1957).
10. SCHOLZ, J., HAUSSLER, A., Excerpta med. Int. Congress Ser. 81, 23 (1964).
11. DUNCAN, L. J. P., BAIRD, J. D., Pharmac.Rev. 12, 91 (1960).
12. PFEIFFER, E. F., SCHOFFLING, K., DITSCHUNEIT, H., ZIEGLER, R. en "Oral hypoglycaemic agents", (Campbell, G. D., Ed.), Academic Press, p. 39, London-New York (1969).
13. SCHOLZ, J., BANDER, A., Dt. med. Wschr. 81, 825 (1956).
14. BANDER, A., HAUSSLER, A., SCHOLZ, J., Dt. med. Wschr. 82, 1557 (1957).
15. BANDER, A., SCHOLZ, J., Dt. med. Wschr. 81, 889 (1956).
16. QUATTRIN, N., JACONO, G., BRACACCIO, A. G., Minerva med. Roma 47, 1777 (1956).
17. STOWERS, J. M., MAHLER, R. F., HUBTER, R. B., Lancet i, 278 (1958).
18. KNAUFF, R. E., FAJANS, S. S., RAMIREZ, E., CONN, J. W., Metabolism 8, 606 (1959).
19. HASSERBLATT, A., BLUDAU, W., Klin. Wschr. 36, 157 (1958).
20. DULIN, W. E., MORLEY, E. E., NEZAMIS, J. E., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 93, 132 (1956).

21. DESPOPOULOS, A., CALLAHAN, P. X., Am. J. Physiol. 203, 19 (1962).
22. BRATTON, C., MARSHALL, E. K. Jr., J. Biol. Chem. 128, 537 (1939).
23. MOSS, D. G., J. clin. Path. 10, 371 (1957).
24. THOMPSON, R. H. S., J. clin. Path. 10, 396 (1957).
25. SPINGLER, H., Klin. Wschr. 35, 533 (1957).
26. STUHLFAUTH, K., Klin. Wschr. 38, 825 (1960).
27. SUDHOF, H., ALTEMBERG, S., SANDER, E., Klin. Wschr. 36, 585 (1958).
28. DESPOPOULOS, A., SONNENBERG, H., Am. J. Physiol. 212, 1117 (1967).
29. RIDOLFO, A. S., KIRTLEY, W. R., J. Am. med. Ass. 160, 1285 (1956).
30. LEE, C. C., ANDERSON, R. C., CHEN, K. K., Archs. int. Pharmacodyn. Ther. 113, 302 (1958).
31. HOUSSAY, B. A., PENHOS, J. C., Metabolism 5, 727 (1956).
32. FRITZ, I. B., MORTON, J. V., WEINSTEIN, M., LEVINE, R., Metabolism 5, 744 (1956).

33. CAREN, R., CORBO, L., J. clin. Invest. 86, 1546 (1957).
34. COX, R. W., HENLEY, E. D., FERGUS, E. B., WILLIAMS, R. H.,  
Diabetes 5, 358 (1956).
35. COX, R. W., HENLEY, E. D., WILLIAMS, R. H., Diabetes 5,  
366 (1956).
36. GORDON, M. F., BUSE, J. F., LUKENS, F. D. W., Diabetes  
6, 7 (1957).
37. LOUBATIERES, A., C. r. Seanc. Soc. Biol, 138, 766 (1944).
38. LOUBATIERES, A., Archs. int. Physiol. 54, 174 (1946).
39. LOUBATIERES, A., BOUTARD, P., de LACLOS, C. D., SASSINE,  
A., C. r. Seanc. Soc. Biol, 150, 1601 (1956).
40. RODRIGUEZ-MINON, J. L., OYA, J. C., Revta. clin. esp. 66,  
303 (1957).
41. KIRTLEY, W. R., RIDOLFO, A. S., ROOT, A. A., ANDERSON, R.  
C., Diabetes 5, 351 (1956).
42. CREUTZFELDT, W., BOTTCHEK, K., Dt. med. Wschr. 81, 896  
(1956).
43. STEWART, G. A., Annls. Endocr. 18, 230 (1957).
44. MIRSKY, I. A., PERISUTTI, G., DIENGOTT, D., JINKS, R.,  
Proc. Soc. Exp. Biol, Med. 91, 475 (1956).

45. LANG, S., SHERRY, S., Metabolism 5, 733 (1956).
46. DULIN, W. E. JOHNSTON, K. L., Ann. N. Y. Acad. Sci. 71, 177 (1957).
47. LOUBATIERES, A., BOUYARD, P., de LACLOS, C. F., SASSINE, A., C. r. Seanc, Soc. Biol. 150, 770 (1956).
48. LOUBATIERES, A., BOUYARD, P., de LACLOS, C. F., C. r. Seanc. Soc. Biol. 149, 2187 (1955).
49. LACY, P. E., HARTROFT, W. S. T., Ann. N. Y. Acad. Sci. 82, 287 (1959).
50. CREUTZFELDT, W., DETERING, L., WEIßE, O., Dt. med. Wschr. 82, 1564 (1957).
51. CREUTZFELDT, W., FINTER, H., Dt. med. Wschr. 81, 892 (1956).
52. WILLIAMSON, J. R., LACY, P. E., GRISHAM, J. W., Diabetes 10, 460 (1961).
53. THERET, C., TAMBOISE, E., Annls. Endocr. 24, 169 (1963).
54. DAVIDSON, J. K., HAIST, R. E., Diabetes 11, (suppl.), 115 (1962).
55. BOUMAN, P. R., GAARENSTROOM, J. H., Metabolism 10, 1095 (1961).
56. COORE, H. G., RANDLE, P. J., Biochem. J. 84, 78 (1962).

57. COORE, H. G., RANDLE, P. J., Biochem. J. 93, 66 (1964).
58. FRERICHs, H., CREUTZFELDT, W. V., Congr. Int. Diab. Fed. Toronto (1964).
59. CREUTZFELDT, W., FRERICHs, H., REICH, U., en "Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets". Proc. III Symp. Int. Stokh. Upps., Sweden 1963, (Brolin, S. E., Hellman, B., Knutson, H., Eds.) Pergamon Press, p. 323, London-New York (1964).
60. RODRIGUEZ-CANDELA, J. L., MARTIN HERNANDEZ, D., CASTILLA CORTAZAR, T., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112, 898 (1963).
61. RODRIGUEZ-CANDELA, J. L., CASTILLON, A. M., MARTIN HERNANDEZ, D., CASTILLA CORTAZAR, T., Medna. exp. 11, 47 (1964).
62. LACY, P. E., YOUNG, D. A., FINK, C. J., Endocrinology 83(6), 1155 (1968).
63. MEHNERT, H., SCHAFER, G., KALIAMPETSOS, G., STUHLFAUTH, K., ENGELHARDT, W., Klin. Eschr. 40, 1146 (1962).
64. GRODSKY, G. M., CURRY, D. L., BENNETT, L. L., LECHARNY, B., Symposium at the Medical Division of the Oak Ridge Institute of Nuclear Studies, Nov. 13 (1967).
65. CURRY, D. L., BENNET, L. L., GRODSKY, G. M., Endocrinology 83, 572 (1968).

66. LOUBATIERES, A., en "Mechanism and regulation of insulin secretion", (Levine, R., Pfeiffer, E. F., Eds.), Acta Diabetológica Latina 5, suppl. 1, 220 (1968).
67. MALAISSE, W. J., MAYHEW, D. A., WRIGHT, P. H., en "Tolbutamide after ten years" N° 149, (Butterfield, W. J. H., van Werstering, W., Eds.), Excerpta Med. Int. Congress. Ser., p. 49, Amsterdam (1967).
68. CREUZFELDT, W., FREINCHS, H., CREUTZFELDT, C., en "Tolbutamide after ten years" N° 149, (Butterfield, W. J. H., van Werstering, W., Eds.), Excerpta Med. Int. Congress Ser., p. 34, Amsterdam (1967).
69. MALAISSE, W. J., MALAISSE-LAGAE, F., J. Lab. clin. Med. 72, 438 (1968).
70. CERASI, E., CHOWWERS, I., LUFT, R., WIDSTROM, A., Diabetologia 5, 343 (1969).
71. SAMOLS, E., MARRI, G., MARKS, V., Diabetes 15, 855 (1966).
72. HELLMAN, B., IDAHL, L. Å., Endocrinology 84, 1 (1969).
73. MARTIN, J. M., BAMBERS, G., Amer. J. Physiol. 209, 797 (1965).
74. ASHCROFT, S. J. H., RANDLE, P. J., Lancet I, 278 (1968).
75. HIRATA, Y., FUJISAWA, M., SATO, H., ASANO, T., KATSUKI, S., Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 471 (1966).



76. KUZUYA, T., KANAZAWA, Y., KOSAKA, K., Metabolism, 15, 1149 (1966).
77. MONTAGUE, W., HOWELL, S. L., TAYLOR, K. W., Nature 215, 1088 (1967).
78. MONTAGUE, W., HOWELL, S. L., TAYLOR, K. W., Diabetologia (1967).
79. TOUSTER, O., SHAW, D. R. D., Physiol. Rev. 42, 181 (1962).
80. WILSON, R. B., MARTIN, J. M., Diabetes 19, 17 (1970).
81. TURTLE, J. R., LITTLETON, G. K., KIPNIS, D. M., Nature 213, 727 (1967).
82. LAMBERT, A. E., JEANRENAUD, B., RENOLD, A. E., Lancet i, 819 (1967).
83. YALOW, R. S., BLACK, H., VILLAZON, M., BERSON, A. A., Diabetes 9, 356 (1960).
84. PFEIFFER, E. F., IV Kongr. Int. Diab. Vereinigg. Genf, 1, 671 (1961).
85. RICHTER, H., Acta Biol. Med. Ger. 10(1-2), 56 (1963).
86. SHELLEY, TH. F., FRAWLEY, TH. F. MARGULIES, E. J., Metabolism 10, 275 (1961).
87. ASHMORE, J., CAHILL, G. F., HASTINGS, A. B., Metabolism 5, 774 (1956).

88. ASHMORE, J., HASTINGS, A. B., NESBETT, F. B., RENOLD, A. E., J. Biol. Chem. 218, 77 (1956).
89. SINGH, M. P., Indian J. Med. Sci. 17, 47 (1963).
90. HENRY, W. L., KIM, J. H., HALL, A. S., Am. J. Physiol. 192, 514 (1958).
91. MILLER, W. L., KRAKE, I. J., BROOK, M. J., J. Pharmac. Exp. Ther. 119, 513 (1957).
92. LUNDBAEK, K., RAFAELSEN, O. J., Lancet i 1036 (1958).
93. RAFAELSEN, O. J., LUNDBAEK, K., Metabolism 8, 757 (1959).
94. RAFAELSEN, O. J., Metabolism, 8, 195 (1959).
95. ORTIGOSA, M. J., GARCIA-FERNANDEZ, M. C. RODRIGUEZ-CANDELA, R., RODRIGUEZ-CANDELA, J. L., Revta. iber. Endocr. 5, 31 (1957).
96. RECANT, L., FISCHER, G. L., Ann. N. Y. Acad. Sci. 71, 62 (1957).
97. QUIJADA, C. L., RODRIGUEZ-CANDELA, R., RODRIGUEZ-CANDELA, J. L., Med. Exp. 6, 61 (1962).
98. FELDMAN, J. M., LEBOVITZ, H. E., Diabetes 18, 84 (1969).

99. "Liquid Scintillation Counting". Proceedings of a Conference held at Northwestern University. August 20-22, 1957. Pergamon Press, London-New York, (1958).
100. RAPKIN, E., en "Hidroxide of Hyamine 10-X", Packard Technical Bulletin, N° 3 revised, (1961).
101. RAPKIN, E., en "Solubilization Techniques N° 1", Technical Review, Intertechnique, (1969).
102. PACKARD INST. CO. INC. "Solvene<sup>TM</sup>. 100", Chemical Notes (1968).
103. SCHAUH'S OUTLINE SERIES: "Theory and Problems of Statistics", (Spiegel, M. R., Ed.), Mc Graw-Hill Book Company, New York, (19 ).
104. STANDARD MATHEMATICAL TABLES, 13<sup>th</sup> Ed., The Chemical Rubber Co., Cleveland (1964).
105. BOYD, G. A., en "Autoradiography in Biology and Medicine", Academic Press, New York (1955).
106. ROGERS, A. W., en "Techniques of autoradiography", Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1967).
107. ROMEIS, B., en "Guía formulario de técnica histológica" Labor, Barcelona (1936).
108. ROTH, L. J., STUMPF, W. E., en "International Conference on Radiactive Isotopes in Pharmacology", Geneva 20-23 Sept.

1967. (Waser, P. G., Glasson, B., Eds.), Wiley-Interscience, London (1969).
109. SMITH, K. R. Jr., J. Nucl. Med. 9(6), 241 (1967).
110. BELENGER, L. F., LEBLOND, C. P., Endocrinology 39, 8 (1946).
111. JOFTES, D. L., WARREN, S., J. Biol. Phot. Assoc. 23, 145 (1955).
112. BARRIMAN, R. W., HERZ, R. H., STEVENS, G. W., Brit. J. Radiol. 23, 472 (1950).
113. DONIACH, I., PELC, S. R., Brit. J. Radiol., 23, 184 (1950).
114. ALONSO SAMANIEGO, J. M., Span. Pat. 229.696, July 31 (1956), (C. A. 51, 7413 c).
115. DAS GUPTA, S. J., Indian J. Appl. Chem. 22, 38 (1959).
116. INSTITUTO DE ANGELI; Brit. Pat. 789.788, Jan. 29 (1958), (C. A. 52, 13791 d).
117. TANABE DRUG MANUFG. CO., Japan Pat. 2371 ('60) Mar. 17 (C. A. 54, 20985 h).
118. C. F. BOEHRINGER & SOEHNE, Ger. Pat. 1, 127.345, Apr. 12 (1962) (C. A. 57, 11110 g).
119. MURRAY, A., WILLIAMS, L., en "Orgánico Syntheses with Isotopes", II, Interscience Publishers Inc., New York (1958).

120. GERSTENBERG, E., HASSELBLATT, A., SCHMIDT, G., Arch. exp. Path. Pharmac. 231, 407 (1957).
121. MARSHALL, E. K., CUTTING, W. C., EMERSON, K., Science 85, 202 (1937).
122. STADTMAN, E. R., NOVELLI, G. D., LIPMAN, F., J. Biol Chem. 191, 365 (1951).
123. GOVIER, W. C., J. Pharmacol. Exptl. Therap. 150, 305 (1965).
124. DAOUST, A. C., CANTERO, A., Cancer Res. 19, 757 (1959).
125. FERGUSON, L. N., en "Electron Structure of Organic Molecules" Prentice Hall, New York (1952).
126. PEREZ-OSORIO, R., en "Mecanismo de las reacciones orgánicas", Alhambra, Madrid (1958).
127. HANDBOOK OF BIOLOGICAL DATA, (Spector, W. S. Edt.) W. B. Saunders Company, Philadelphia-London (1956).
128. HAMMARSTROM, L., ULLBERG, S., Nature 212, 708 (1966).
129. MARTIN, D. B., CARTER, J. R., Science 167, 873 (1970).
130. PARK, C. R., REINWEIN, D., HENDERSON, M. J., CADENAS, E., MORGAN, H. E., Am. J. Med. 26, 674 (1959).
131. BATTAGLIA, F. C., RANDLE, P. J., Biochem. J. 75, 408 (1960).

132. MORGAN, H. E., HENDERSON, M. J., REGEN, D. M., PARK, C. R., J. Biol. Chem. 236, 253 (1961).
133. NARAHARA, H. T., OZARD, P., CORI, C. F., J. Biol. Chem. 235, 3370 (1960).
134. WIDDAS, W. F., en "Carbohydrate Metabolism and its Disorders", I, (Dickens, F., Randle, P. J., Wheland W. D., Eds.) Academic Press, p. 1, London-New York (1967).
135. MORGAN, H. E., REGEN, D. M., PARK, C. R., J. Biol. Chem. 239, 369 (1964).
136. CROFFORD, O. B., J. Biol. Chem. 243, 362 (1968).
137. DIEDRICH, D. F., STRINGAM, C. H., Arch. Biochem. and Biophys. 138, 499 (1970).
138. LE FEVRE, P. G., Science 130, 104 (1959).
139. FORSLING, M. F., WIDDAS, W. F., J. Physiol. 178, 12 (1965).
140. SEN, A. K., WIDDAS, W. F., J. Physiol. 160, 392 (1962).
141. DAWSON, A. C., WIDDAS, W. F., J. Physiol. 168, 644 (1963).
142. WOHLTMANN, H. J., NARAHARA, H. T., J. Biol. Chem. 241, 4931 (1966).
143. GARRATT, C. J., JARRET, R. J., KEEN, H., Biochim. Biophys. Acta 121, 143 (1966).

- 109-
144. BEWSHER, P. D., HILLMAN, C. C., ASHMORE, J., Med. Pharmacol. 2, 227 (1966).
  145. BUTCHER, R. W., BAIRD, C. E., SUTHERLAND, E. W., J. Biol. Chem. 243, 1705 (1968).
  146. KONO, T. J., Biol. Chem. 244, 1772 (1969).
  147. KONO, T. J., Biol. Chem. 244, 5777 (1969).
  148. KATZEN, H. M., GLITZER, M. S., en "Carbohydrate Metabolism and its Disorders" II, (Dickens, F., Randle, P. J., Wheland, W. J., Eds.), Academic Press, p. 265, London-New York (1967).
  149. ANTONIADES, H. N., RENOLD, A. E., DAGENAIS, Y. M., STEINKE, J., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103, 677 (1960).
  150. ANTONIADES, H. N., GUNDERSEN, K., BEIGELMAN, P. M., PYLE, H. M., BOUGAS, J. A., Diabetes 11, 261 (1962).
  151. ANTONIADES, H. N., BOUGAS, J. A., CAMERINI-DAVALOS, R. A., PYLE, H. M., Diabetes 13, 230 (1964).
  152. ANTONIADES, H. N., Lancet. 1, 159 (1965).
  153. SAMAAAN, N. A., DEMPSTER, W. J., FRASER, R., PLEASE, N. W., STILLMAN, D., J. Endocr. 24, 263 (1962).
  154. SAMAAAN, N. A., FRASER, R., DEMPSTER, W. J., Diabetes 12, 339 (1963).

- 170-
155. FROESCH, E. R., BURGI, H., RAMSEIER, E. B., BALLY, A., LABHART, A., J. Clin. Invest. 42, 1816 (1963).
  156. BURGI, H., MULLER, W. A., HUMBLE, R. E., LABHART, A., FROESCH, E. R., Biochim. Biophys. Acta t, 121, 349 (1966).
  157. OELZ, O., JACOB, A., FROESCH, E. R., Schweiz. Med. Wochenschr. 100(12), 539 (1970).
  158. ANTONIADES, H. N., 2 nd. Inter. Symp. Endocr. Excerpta Med. Int. Cong. Series, N<sup>o</sup> 83, p. 342, London (1964).
  159. BERSON, S. A., YALOW, R. S., Diabetes 14, 549 (1965).
  160. GRODSKY, G. M., FORSHAM, P. H., A. Rev. Physiol. 28, 347 (1966).
  161. ANTONIADES, H. N., BOUGAS, J. A., CAMERINI-DAVALOS, R. A., PYLE, H. M., MAZURKIE, S. J., LOZANO-CASTANEDA, O., MARBLE, A., New England J. Med. 269, 386 (1963).
  162. HASSELBLATT, A., Metabolism 12, 302 (1963).
  163. SALANS, L. B., REAVEN, G. M., Metabolism 14, 26 (1965).
  164. DOBRZAUSKI, T., Endokrynol. Polska 15(5), 501 (1964).
  165. BHIDE, M. B., AIDAN, R., Indian J. Med. Res. 51(4), 733 (1963).



## ANEXO I

### Abreviaturas y Simbolos

A	actividad.
Ar	actividad remanente.
AMP	adenosin-5'-fosfato.
C	número de cuentas por minuto.
°C	grado centígrado.
conc.	concentrado.
cpm	cuentas por minuto.
D	depuración renal.
d	densidad óptica.
2-DG	2-desoxiglucosa.
E	eficiencia del conteo.
e	base de logaritmos neperianos.
f	factor de corrección por autoextinción.
G	número de grados de libertad.
g	grado de extinción.
HV	alto voltaje.
K	constante.
Kg	kilogramo.
M	molaridad.
Mev	megaelectronvoltio.
m	cantidad de tejido solubilizado.
mCi	milicurio.
mg	miligramo.
min	minuto.
ml	mililitro.

N	normalidad.
NSILA	actividad insulínica no-supresible.
n	número de pares de valores muestrales.
nm	nanometros.
p.f.	punto de fusión.
PPO	2,5-difeniloxazol.
POPOP	2-p-fenilenbis-(5-feniloxazol).
pH	logaritmo decimal de la concentración de hidrogeniones (cambiado de signo).
p%	nivel de significación.
R <sub>f</sub>	cociente entre el desplazamiento cromatográfico de un compuesto y el desplazamiento del frente de una determinada fase móvil.
r	índice de correlación lineal.
s <sub>y.x</sub>	error standard de la recta de regresión de los valores de <u>y</u> sobre los de <u>x</u> .
t	estadístico de Student.
u	valor medio de <u>y</u> para un valor determinado de <u>x</u> , en la muestra infinita.
V	voltios.
x <sub>i</sub>	valores muestrales de x.
x <sub>t</sub>	valores teóricos de x.
$\bar{x}$	valor medio de x.
y <sub>e</sub>	valores experimentales de y.
y <sub>i</sub>	valores muestrales de y.
y <sub>t</sub>	valores teóricos de y.

$\bar{y}$	valor medio de y.
$\mu\text{Ci}$	microcurio.
$\mu\text{U}$	microunidad.
$\rho$	número de parámetros.
%	tanto por ciento.
$\chi^2$	estadístico chi-cuadrado de Pearson.
$>$	mayor que.
$\leq$	menor o igual que.
$\#$	átomo radiactivo.

ANEXO II

Indice de Tablas

I	Desintegración del $^{35}\text{S}$ . La radiactividad remanente se expresa como tanto por ciento del valor inicial . . . . .	36
II	Determinación del límite inferior de altura de impulso . . . . .	40
III	Determinación del límite superior de altura de impulso . . . . .	41
IV	Variación del valor del conteaje de una muestra de $^{35}\text{S}$ , con la cantidad de Solueno presente en la misma . . . . .	50
V	Eficiencia en el conteaje de muestras de diferentes tejidos . . . . .	55
VI	Valores de $K$ y $\underline{r}$ de las funciones que relacionan el grado de extinción con la cantidad de tejido solubilizado . . . . .	56
VII	Valores de los parámetros A y B y del índice de correlación $\underline{r}$ de las funciones que relacionan la densidad óptica y la cantidad de tejido solubilizado . . . . .	57
VIII	Densidad óptica de las muestras a 425 nm, grado de extinción y factor de corrección. .	62

IX	Pérdida de peso y actividad en el proceso de fijación y deshidratación de tejidos. . . .	78
X	Disolventes y valores de $R_f$ cromatográficos. . . . .	92
XI	Actividad acumulada en órganos completos y sangre, a las 3 horas de administrar una dosis A de carbutamida marcada . . . . .	102
XII	Actividad acumulada en órganos completos y sangre, a las 3 horas de administrar una dosis B de carbutamida marcada. . . . .	104
XIII	Actividad excretada en heces, despues de administrar $19'15$ uCi de carbutamida marcada . . . . .	111
XIV	Eliminación de carbutamida marcada en orina . . . . .	113
XV	Relación entre las concentraciones de $N^4$ -acetilcarbutamida- $^{35}S$ y carbutamida- $^{35}S$ en sangre y orina, a distintos tiempos después de administrar una dosis A de carbutamida- $^{35}S$ . . . . .	127

ANEXO III

Indice de Figuras



1. Determinación del voltaje de operación.
2. Determinación del límite superior de altura de impulso.
3. Eficiencia en el conteo de  $^{35}\text{S}$ .
4. Influencia del Solueno en el conteo.
5. Extinción en el conteo de diferentes tejidos, en función de la cantidad de tejido solubilizado.
6. Densidad óptica de las muestras, en función de la cantidad de tejido solubilizado.
7. Grado de extinción en función de la densidad óptica de las muestras.
8. Factor de corrección por extinción debida a color, en función de la densidad óptica de las muestras.
9. Microautorradiografía de hígado (x160), después de 5 días de exposición.
10. Microautorradiografía de hígado (x160), después de 15 días de exposición.
11. Microautorradiografía de hígado (x160), después de 30 días de exposición.
12. Microautorradiografía de riñón (x400), con secado

rápido de la película y 15 días de exposición.

13. Microautorradiografía de riñón (x400), con secado rápido de la película y 30 días de exposición.
14. Microautorradiografía de riñón (x400), con secado lento de la película y 15 días de exposición.
15. Niveles de radiactividad a las 3 horas de administrar una dosis A.
16. Radiactividad acumulada en órganos completos a las 3 horas de administrar una dosis A.
17. Distribución de radiactividad en órganos, a diferentes tiempos después de administrar una dosis A.
18. Niveles de radiactividad a las 3 horas de administrar una dosis B.
19. Radiactividad acumulada en órganos completos a las 3 horas de administrar una dosis B.
20. Distribución de radiactividad en órganos, a diferentes tiempos después de administrar una dosis B.
21. Niveles hemáticos de radiactividad, después de administrar una dosis A, expresados en % del nivel inicial.

22. Niveles hemáticos de radiactividad, después de administrar una dosis B, expresados en % del nivel inicial.
23. Concentración radiactiva en sangre y en hígado después de administrar una dosis A.
24. Concentración radiactiva en sangre y en hígado después de administrar una dosis B.
25. Excreción acumulativa de carbutamida en orina.
26. Análisis cromatográfico de orina, después de administrar carbutamida marcada.
27. Autorradiografía del cromatograma de la FIG. 26.
28. Concentración radiactiva de carbutamida-<sup>35</sup>S, N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida-<sup>35</sup>S y concentración radiactiva total, después de administrar una dosis A de carbutamida marcada. (orina).
29. Concentración radiactiva de carbutamida-<sup>35</sup>S, N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida-<sup>35</sup>S y concentración radiactiva total, después de administrar una dosis B de carbutamida marcada. (orina).
30. Concentración radiactiva de N<sup>4</sup>-acetilcarbutamida-<sup>35</sup>S en orina, expresada como % de la concentración radiactiva total, en función del tiempo.

31. Microautorradiografía de hígado (x400).
32. Microautorradiografía de hígado (x400).
33. Microautorradiografía de hígado (x400).
34. Microautorradiografía de hígado (x400).
35. Microautorradiografía de riñón (x400).
36. Microautorradiografía de riñón (x400).
37. Microautorradiografía de riñón (x400).
38. Microautorradiografía de riñón (x400).
39. Microautorradiografía de páncreas (x160).
40. Microautorradiografía de páncreas (x400).
41. Microautorradiografía de páncreas (x400).
42. Microautorradiografía de cápsula suprarrenal (x160).
43. Microautorradiografía de cápsula suprarrenal (x160).
44. Microautorradiografía de músculo cardíaco (x160).
45. Microautorradiografía de músculo cardíaco (x400).
46. Microautorradiografía de músculo cardíaco (x400).

47. Microautorradiografía de músculo cardíaco (x400).

48. Microautorradiografía de músculo cardíaco (x400).